

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**



**TESIS DOCTORAL**

***Efecto de hidroxitirosol sobre las complicaciones  
microvasculares en un modelo experimental de  
diabetes mellitus tipo 1***

**María Dolores Rodríguez Pérez**

**Departamento de Farmacología  
y Terapéutica Clínica**



**Laboratorio de Investigaciones  
Antitrombóticas e Isquemia Tisular**


**DIRECTORES:** José Antonio González Correa y José Pedro de la Cruz Cortés

**Málaga, febrero 2021**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: María Dolores Rodríguez Pérez

 <http://orcid.org/0000-0002-8722-4378>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización  
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA. Departamento de Farmacología y Pediatría

**D. JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ CORREA**, Catedrático de Farmacología y  
**D. JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS**, Catedrático de Farmacología, adscritos al  
Departamento de Farmacología y Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad  
de Málaga,

CERTIFICAN:

Que Dña. MARÍA DOLORES RODRÍGUEZ PÉREZ ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: “EFECTO DE HIDROXITIRO SOL SOBRE LAS COMPLICACIONES MICROVASCULARES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1”, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los que la suscriben revisado su tesis y estando conformes para ser juzgada.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado en Málaga, a 12 de febrero de 2021.

**GONZALEZ  
CORREA JOSE  
ANTONIO**

Firmado digitalmente  
por GONZALEZ  
CORREA JOSE  
ANTONIO  
x250516895xxx  
Fecha: 2021.05.21  
12:48:28 +02'00'

J.A. González Correa

**DE LA CRUZ  
CORTES JOS  
E PEDRO**

Firmado digitalmente  
por DE LA CRUZ  
CORTES JOSE PEDRO -  
xxxxxxx  
Fecha: 2021.05.21  
12:48:56 +02'00'

J.P. de la Cruz Cortés





FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. Departamento de Fisioterapia

**D<sup>a</sup>. MARÍA TERESA LABAJOS MANZANARES**, Catedrática de Escuela Universitaria, adscrita al Departamento de Fisioterapiade la Facultad de Cienciasde la Salud de de la Universidad de Málaga,

**CERTIFICA:**

Que Dña. MARÍA DOLORES RODRÍGUEZ PÉREZ ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi tutorización el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: “EFECTO DE HIDROXITIROSOLO SOBRE LAS COMPLICACIONES MICROVASCULARES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1”, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los quien suscribe revisado su tesis y estando conforme para ser juzgada.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expide el presente certificado en Málaga, a 16 de mayo de 2021.

LABAJOS

MANZANARES MARIA  
TERESA Fecha: 2021.05.20

Firmado digitalmente por

LABAJOS MANZANARES

MARIA TERESA -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Fecha: 2021.05.20 20:37:11

**María Teresa Labajos Manzanares**





## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña MARÍA DOLORES RODRÍGUEZ PÉREZ

Estudiante del programa de doctorado CIENCIAS DE LA SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: EFECTO DE HIDROXITIRO SOL SOBRE LAS COMPLICACIONES MICROVASCULARES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

Realizada bajo la tutorización de MARÍA TERESA LABAJOS MANZANARES y dirección de (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)


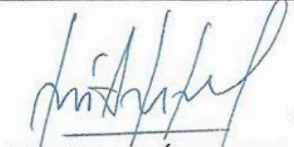
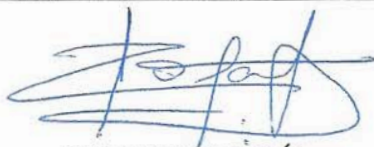
JOSÉ A. GONZÁLEZ CORREA y JOSÉ P. DE LA CRUZ CORTÉS

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 16 de MAYO de 2021

 Fdo.: MD. RODRÍGUEZ PÉREZ Doctorando/a	<p>Firmado digitalmente por LABAJOS MANZANARES MARIA TERESA - 25059731N Fecha: 2021.05.19 20:55:20 +02'00'</p> <p>Fdo.: MT LABAJOS MANZANARES Tutor/a</p>
 Fdo.: JA GONZÁLEZ CORREA Director/es de tesis	 JP DE LA CRUZ CORTÉS



## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña MARÍA DOLORES RODRÍGUEZ PÉREZ

Estudiante del programa de doctorado CIENCIAS DE LA SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: EFECTO HIDROXITIROSOLO SOBRE LAS COMPLICACIONES MICROVASCULARES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

Realizada bajo la tutorización de MARIA TERESA LABAJOS MANZANARES y dirección de JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ CORREA Y JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 12 de FEBRERO de 2021



Fdo.: MARÍA DOLORES RODRÍGUEZ PÉREZ



*“El futuro tiene muchos nombres.*

*Para los débiles es lo inalcanzable.*

*Para los temerosos lo desconocido.*

*Para los valientes es la oportunidad”.*

*Victor Hugo*







## Agradecimientos

El día que dejás de ilusionarte, dejás de disfrutar y apagas los latidos que te llenan de vida. No renuncié a sentir el pulso de mis mejores emociones y es por eso que estoy hoy aquí.

Aún recuerdo allá por 2009 cuando por motivos de la crisis me quedé sin empleo, el mundo se te viene encima...

Pero lejos de hundirme me sobrepuse a este tropiezo que te da la vida y afronté con esperanza el futuro. Entonces alguien muy cercano me pregunta, bien, ¿y ahora que quieres hacer?, a lo que yo respondí, seguir estudiando..., así que me fui a Granada (preciosa ciudad por cierto) para realizar un Master, el cual me dio la oportunidad de entrar en el programa de Doctorado de Ciencias de la Salud y que hoy llega a su fin, fin que será el comienzo de algo nuevo y bueno, eso es lo que espero y deseo.

Mi madre (q.e.p.d.) siempre decía que era importante en la vida ser agradecido, siguiendo su buen consejo deseo expresar mis palabras de gratitud a las siguientes personas que contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

Así pues, quiero agradecer con una mención especial a mis directores de tesis los Doctores y Profesores del departamento de Farmacología y Pediatría de la Facultad de Medicina de Málaga D. José Antonio González Correa y D. José Pedro De La Cruz Cortés, por darme la oportunidad de entrar en su grupo de investigación sin conocerme de nada, por transmitirme sus conocimientos, por su confianza en mí y por su buen hacer durante estos años que sin duda son inolvidables, como buenos maestros han hecho que piense, razone, observe, argumente y respete opiniones y criterios diferentes, lo que ha derivado en que mi amor por la ciencia y por la vida haya crecido de manera exponencial, gracias por vuestra ayuda y colaboración, sin vuestro apoyo los trabajos aquí expuestos no habrían visto la luz. Además, tengo la suerte de haber ganado dos buenos amigos de esos que siempre te alegrarás de ver y estarán presentes toda mi vida.

A los compañeros de laboratorio, los doctores D. José Julio Reyes D. Juan Antonio López Villodres, a María, M<sup>a</sup> José, Miriam, Ana Vazquez, Ana Guerrero, por su amistad e inestimable apoyo, a Antonio Pino (que seguro estará disfrutando de su merecida jubilación) echo de menos los momentos de alegría y risas compartidos con el. A las últimas incorporaciones a este grupo: Sofía, Maksym, Laura, Inma, Laura Ortega,

Cristina, podéis contar conmigo. Gracias a todos por los momentos compartidos y por los que han de venir.

A Manuela Vega y Francisco David Navas, del SCAI (Servicio Central de Ayuda a la Investigación de la UMA) por su gran profesionalidad y ayuda en el desarrollo de los resultados de este estudio.

A mi querida amiga Ana Rosales y familia, compañera de buenos y no tan buenos momentos durante la carrera que estudiamos juntas y que nos unió en una gran amistad de esas verdaderas que son para toda la vida. Gracias por darme ánimos y por estar siempre.

A mi querido amigo Jesús también compañero de carrera, por su apoyo y por esos ratitos de cafés y charlas que sin duda reanudaremos cuando esto de la COVID 19 pase.

A mi estimada y querida amiga Khaoula y su marido Tarek, porque sois un ejemplo a seguir.

A mi querida Rosa por su interés en que avance siempre, gracias por todo tu apoyo.

A mi abuelo Enrique, del que aprendí que la lectura es uno de los mejores placeres de esta vida, gracias a los libros que me daba a leer, creció en mí la curiosidad de todo lo que me rodea, curiosidad que no me abandona para mi suerte.

A mis padres José y Ángela y hermanos, Rafa, Mari Carmen, Ángela, M<sup>a</sup> José, Jesús y Francisco, pero muy especialmente a mi querida madre (allí donde estés) que siempre decía que yo llegaría donde me propusiera, tenías razón ¡lo he conseguido! pero eso mamá, eso tú ya lo sabías... Te echo tanto de menos...

A mis gatitos por su desinteresada compañía y calor haciendo que el estrés acumulado se disipara.

Y gracias a ti José, mi amado compañero, por estar a mi lado siempre, por tu manera y claridad en percibir las cosas, por tu estímulo de seguir siempre adelante (pese a los momentos difíciles que hemos vivido), has demostrando una aptitud siempre cálida, paciente, generosa y altruista, sin duda todo esto sin ti no habría sido posible, ¡la mitad (quizás más) de este doctorado es tuyo! Gracias por existir.

*A todos desde el corazón, muchas gracias, ¡espero y deseo poder abrazaros pronto!*



# INTRODUCCIÓN



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Dieta mediterránea y aceite de oliva

"La dieta mediterránea (DiM) es un conjunto de competencias, conocimientos, prácticas y tradiciones relacionadas con la alimentación humana, que van desde la tierra a la mesa, abarcando los cultivos, las cosechas y la pesca, así como la conservación, transformación y preparación de los alimentos y, en particular, el consumo de éstos", según Unesco. El Comité Intergubernamental de la UNESCO para la Salvaguardia del Patrimonio Cultural Inmaterial (Kenia, 2010), acordó inscribir la Dieta Mediterránea en la Lista representativa del Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad. El comité destaca que los ingredientes principales de esta dieta son "el **aceite de oliva**, los **cereales**, las **frutas y verduras frescas y los frutos secos**, una proporción moderada de carne, pescado y productos lácteos, y abundantes condimentos y especias, cuyo consumo en la mesa se acompaña de **vino** o infusiones, respetando siempre las creencias de cada comunidad" (Trichopoulou and Lagiou, 1997). Además, subraya que la dieta mediterránea -cuyo nombre viene de la palabra griega *diaita*, que quiere decir modo de vida- no comprende solamente la alimentación, sino que es "un elemento cultural que propicia la interacción social". Todo ello conduce a una alimentación muy saludable con extraordinarios beneficios para la salud. Por una parte, protege de enfermedades cardiovasculares además de reducir los niveles de colesterol y por otra, es rica en fibra y antioxidantes que protegen del envejecimiento de las células.

La American Heart Association (AHA) ha destacado la importancia de una dieta saludable en la prevención de las enfermedades cardiovasculares (ECV) y los accidentes cerebrovasculares (Lloyd-Jones et al., 2010). Durante la última década, el enfoque de la epidemiología nutricional se ha desplazado de los nutrientes y los alimentos específicos a los hábitos alimentarios globales, centrando la atención en un enfoque más holístico sobre la dieta que incluye tanto componentes de salud como de placer, es por todo esto por lo que en los últimos años la DiM ha sido y es objeto de numerosos estudios por parte de la comunidad científica en todo el mundo, son muchos los efectos beneficiosos de esta dieta sobre la salud, principalmente sobre su incidencia positiva en la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Babio et al., 2014; Estruch et al., 2013).



Una de las características mejor conocidas y más importantes de la DiM es la presencia del aceite de oliva virgen (AOV) como la principal fuente de grasa monoinsaturada. El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es obtenido del fruto de *Olea europaea L.*, conservando todos sus componentes nutricionales ya que no se refina para su consumo, como ocurre con otros aceites de origen vegetal tales como el de girasol, colza o soja. A diferencia de éstos, el AOVE mantiene todas sus propiedades naturales proporcionando cientos de micronutrientes y antioxidantes entre los que se incluye los compuestos fenólicos (destacando el hidroxitirosol), la vitamina E, los carotenos y el escualeno (Owen et al., 2000).

Sin duda, el estudio PREDIMED (Estruch et al., 2013), supone un hito en cuanto a la consideración de la dieta mediterránea, en general, y el AOVE, en particular, como modelo de alimentación cardiosaludable. Se trata de un ensayo clínico aleatorizado, en el que participaron de 7447 pacientes con alto riesgo cardiovascular. Los sujetos del estudio fueron asignados de forma aleatoria a tres grupos: DiM + AOVE, DiM+ frutos secos y grupo control con dieta con bajo contenido en grasa. El objetivo del estudio era evaluar la eficacia de dos dietas mediterráneas suplementadas con aceite de oliva virgen extra o frutos secos frente a una dieta baja en grasa, sobre la prevención primaria de un evento cardiovascular. Los autores concluyeron que una DiM, suplementada con AOVE o frutos secos, reducía el riesgo de sufrir un evento cardiovascular.

En esta línea, otros autores han evidenciado que un incremento en la ingesta diaria de 10 g de AOVE reduciría un 10% la incidencia de eventos cardiovasculares y un 16% el riesgo de mortalidad cardiovascular en pacientes con alto riesgo cardiovascular (Guasch et al., 2014).

A continuación, recogemos un resumen de los artículos más actuales relacionados con el efecto cardiosaludable de los polifenoles en el ser humano. La información aquí recogida forma parte de un artículo en elaboración titulado “Influencia de los polifenoles de la dieta sobre la enfermedad cardiovascular: efecto a corto, medio y largo plazo”, que además se ha plasmado en un trabajo fin de grado de Medicina, presentado por la alumna Dña. Carmen Pardo Mercado.

### **1.1.1. Estudios clínicos sobre dieta mediterránea (DiM) y/o aceite de oliva virgen extra (AOVE)**

#### **1.1.1.1. Estudios en individuos sanos**

Las dietas estudiadas sobre individuos sanos reportan que la DiM y dentro de la misma los polifenoles del AOV, previene de enfermedades cardiovasculares al favorecer la relación entre LDL/HDL, tienen un efecto directo sobre la morfología de la arteria, concretamente sobre el grosor y área de la arteria carótida según. Las dietas suplementadas con frutos secos o con AOVE fueron las de mayor beneficio. El éxito de esta dieta se debe a su composición grasa, el AOV que posee un alto contenido en ácido oleico y polifenoles siendo el más estudiado el hidroxitirosol, todas estas sustancias son potentes antioxidantes además de presentar efectos vasodilatadores y claros efectos antiinflamatorios.

Los estudios de Castaner et al. (2011, 2012), así como el estudio de Hernáez et al. (2014, 2015), sobre individuos sanos, reportaron el efecto beneficioso de los polifenoles sobre la reducción en la oxidación del LDL y el incremento de HDL respectivamente. Los estudios aludidos se centraban en el componente principal de la DiM: el AOVE.

Gardener et al. (2014), estudiaron el efecto de la DiM sobre la aterosclerosis en individuos que no presentaban enfermedad cardiovascular. Para ello determinaron el grosor y área de la arteria carótida, observando una disminución moderada de la placa aterosclerótica carotídea asociada al consumo de la DiM.

El estudio de Courtney et al. (2015), compara el consumo de la DiM con el consumo de una versión australiana de la DiM conocida como Australianised. Los resultados de ambas dietas a nivel cardiovascular son favorables, si bien la DiM consigue una reducción de los lípidos plasmáticos y de la glucemia que no alcanza la modificación Australiana.

Martínez-González et al. (2014), estudiaron el comportamiento de la DiM a largo plazo sobre la aparición de fibrilación auricular en individuos sanos. La DiM suplementada con AOVE disminuye significativamente el riesgo de padecer un evento de Fibrilación auricular con respecto al grupo control.

Algunos estudios se han centrado en valorar el efecto de los polifenoles contenidos en el AOVE, principalmente utilizando el extracto de las hojas de oliva (donde la concentración de polifenoles es más alta). En uno de los estudios se evidenció que la ingesta de 20 mL/día de un extracto de hojas de olivo influía sobre la regulación de genes implicados en el proceso de inflamación disminuyéndola (Boss et al., 2016).

También hemos recogido en la bibliografía estudios en los que el empleo de DiM, AOVE y/o extractos no aportan ningún resultado beneficioso respecto al control. En este sentido, el estudio de Wong et al. (2014), que utiliza extractos de componentes de alimentos de la DiM tales como extracto de la hoja de olivo, granos de café verde (no tostados) y extracto de remolacha, sobre el efecto hipertensivo, no encontró modificación de las cifras de presión arterial respecto a los sujetos que no ingirieron esos productos.

Asimismo, el estudio de Silva. et al. (2015), muestra como en individuos sanos la DiM suplementada con aportes de AO con elevada concentración de polifenoles y baja concentración de polifenoles a corto plazo (seis semanas) no produce cambios en los niveles de biomarcadores proteómicos urinarios de enfermedades tales como: cardiovasculares, diabetes tipo 1 y 2 y enfermedad renal crónica.

#### **1.1.1.2. Estudios sobre individuos con enfermedad vascular o con elevado riesgo de sufrir un evento cardiovascular**

En aquellos estudios sobre pacientes que tienen una alta probabilidad de padecer diabetes mellitus tipo 2, (Salas-Salvadó et al. 2011), así como en estudios con personas que la padecen se demuestra que la DiM mejora y en su caso previene dicha enfermedad.

Tanto los productos obtenidos de la ingesta de alimentos que forman parte de la dieta como extracto de estos, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, como se ha podido evaluar en los estudios de Droste et al. (2013), de Bock et al. (2013), Boss et al. (2016) Imamura et. al. (2017), donde analizan el efecto del consumo de vino tinto o extracto de hoja de olivo respectivamente ambos ricos en polifenoles, principal compuesto del AOVE.

Actualmente se sabe que los compuestos fenólicos son mucho más que simples antioxidantes, están implicados en numerosos mecanismos y rutas metabólicas que son las que les atribuyen las propiedades beneficiosas. Entre estos efectos están aquellos sobre la mejora de procesos inflamatorios, (Urpi-Sarda et al. 2012; Casas et al. 2014), obesidad, diabetes, síndrome metabólico, (Babio et al. 2014) (Mayneris-Perxachs et al. 2014) y enfermedad cardiovascular o elevado riesgo cardiovascular, (Estruch et al. 2013).

Cabe destacar como la DiM también tiene influencia beneficiosa sobre los factores epigenéticos (Arpón et al., 2017; Yubero-Serrano et al., 2020), en tanto que previenen enfermedades vasculares, demostrándose en este estudio la relación directa entre los hábitos saludables y la modulación en la expresión de los genes debido a factores como la metilación del DNA, aunque aún deben realizarse más estudios que apoyen esta relación.

En el estudio de Salas-Salvadó et al. (2011), sobre pacientes con alta probabilidad de padecer diabetes mellitus tipo 2, se demostró que el seguimiento a largo plazo de la DiM disminuía el riesgo de padecer un evento cardiovascular y también disminuía la probabilidad de aparición de diabetes mellitus tipo 2, siendo este efecto mayor en las dietas suplementadas.

De Bock et al. (2013), analizan el efecto de extracto de hoja de olivo, rico en polifenoles, sobre la sensibilidad a la insulina. Los resultados pusieron de manifiesto una mejora de la sensibilidad a insulina y de la capacidad de respuesta de las células  $\beta$  pancreáticas.

También se ha comprobado que una DiM complementada con aceite de oliva puede contrarrestar los efectos de la hiperglucemia aguda y puede mejorar la resistencia del endotelio sobre la acción de GLP-1 mejorando de este modo la función endotelial (Ceriello et al. 2014).

Otros autores han investigado el papel de la DiM en relación al síndrome metabólico. En este sentido, Babio et al. (2014) y de Mayneris-Perxachs et al. (2014), obtuvieron como resultado que la DiM a largo plazo, previene y en su caso retrasa la aparición de este proceso.

Como ya se ha apuntado a lo largo de esta introducción, la DiM con o sin la suplementación de AOVE u otros alimentos, frutos secos, alimentos ricos en licopenos, presenta un efecto cardiosaludable e influye de manera satisfactoria en la reducción de eventos cardiovasculares.

En línea con lo anteriormente comentado, el estudio PREDIMED (Estruch et al., 2013), sobre la prevención de enfermedad cardiovascular a largo plazo, tuvo como resultado una disminución muy significativa del riesgo de padecer un evento vascular con el consumo de la DiM suplementada con AOVE o frutos secos.

En el análisis del efecto de la DiM sobre biomarcadores de la inflamación en pacientes con elevado riesgo de sufrir un evento cardiovascular, (Casas et al. 2014), obtuvieron como resultado que el consumo de DiM se asociaba con una menor probabilidad de aparición de enfermedad cardiovascular.

Un estudio que investigó sobre el aporte de frutos secos en la DiM en relación con la frecuencia de muertes por eventos cardiovasculares comprobó cómo este aporte de frutos secos se asoció a una disminución significativa del riesgo de muerte por evento cardiovascular (Guasch-Ferré et al. 2013). De igual manera, comprobaron que el consumo de aceite de oliva en la DiM reducía la mortalidad causada por evento cardiovascular (Guasch-Ferré et al. 2013).

El estudio de sobre el efecto de la DiM sobre la presión arterial a largo plazo se obtuvo un resultado satisfactorio, evidenciándose una disminución de dicha presión en los sujetos del estudio que siguieron una DiM (Toledo et al. 2013).

Otros estudios han evaluado de forma indirecta el papel de la DiM, polifenoles y otros antioxidantes como el licopeno, sobre la enfermedad cardiovascular. En este sentido, se observó como el empleo de DiM suplementada con frutos secos, se asocia con un retraso en la progresión de la placa aterosclerótica de la arteria carótida. (Sala-Vila et al., 2014).

Widmer et al. (2013), analizando el efecto de los polifenoles del AOV y Gajendragadkar et al. (2014), el efecto del licopeno, en ambos casos sobre la función endotelial, observaron un efecto beneficioso sobre dicha función. Por otro lado, Yubero-Serrano et al. (2020), comprobaron que la DiM, en comparación con una dieta



baja en grasas, mostraba una reducción de eventos cardiovasculares. Esta reducción en la incidencia de eventos estuvo relacionada con la modulación sobre la homeostasis vascular en paciente con cardiopatías coronarias previas, incluso en aquellos pacientes que presentaban una disfunción endotelial grave.

El efecto de la DiM y el AOVE sobre los lípidos plasmáticos ha sido también estudiado en profundidad. La reducción de los niveles de LDLc y el incremento de HDLc pueden constituir un papel relevante en la menor incidencia de enfermedad cardiovascular (Fernández -Castillejo et al., 2016; Maki et al., 2015; Verhoeven et al., 2015,).

En línea con los efectos comentados anteriormente sobre el perfil lipídico, otros estudios han evaluando los antioxidantes contenidos en el vino y cerveza y se ha visto que aportan resultados similares. Entendiendo que en la DiM se contempla el consumo moderado de vino, podríamos pensar en un efecto complementario al del AOVE.

En el estudio de Droste et al. (2013), asocia el consumo moderado de vino tinto con la disminución de lípidos en plasma en pacientes con aterosclerosis carotídea, aunque la mayoría de ellos estaban tratados con estatinas. En un estudio sobre el efecto de resveratrol sobre la presión arterial y el estrés oxidativo en 50 pacientes con diabetes mellitus tipo 2, se observó una disminución en las cifras de presión arterial y el estrés oxidativo, lo que se asoció con una reducción en la progresión de la aterosclerosis. (Imamura et al., 2017). Chiva-Blanch et al. (2015) analizaron el efecto del consumo de cerveza con o sin alcohol, rica en polifenoles, sobre los biomarcadores de aterosclerosis. Estos autores observaron una disminución de biomarcadores relacionados con la inflamación, así como una mejora en el perfil lipídico asociada con el consumo de polifenoles.

En relación con la respuesta inflamatoria y la inmunomodulación, también hemos encontrado en la literatura artículos que valoran la influencia sobre ellos debido a la DiM. En el estudio de Urpi-Sarda et al. (2012) donde se evalúa el efecto de la DiM sobre citocinas inductoras de la respuesta inflamatoria a nivel endotelial, se observó una disminución de TNFalfa y de su receptor FNTR1 (p60).

Por otro lado, Casas et al. (2016), valoraron el efecto inmunomodulador a largo plazo que ejerce la DiM en personas con elevado riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular. Observaron que la DiM se asoció con una reducción de la expresión de

moléculas de adhesión en linfocitos T, así como de biomarcadores de inflamación. Los autores concluyen que estos efectos reducirían la posibilidad de aparición de un evento cardiovascular.

Por último, debemos destacar el papel de la dieta en la expresión de genes, lo que se relacionaría a una disminución en la incidencia de enfermedades asociadas a factores epigenéticos. Se ha observado como la DiM asociada con frutos secos o AOVE reduce la metilación del DNA de los glóbulos blancos (Arpón et al. 2017).

**TABLA 1.** ESTUDIO ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIFENOLES DE LA DIETA O ALGUNOS DE SUS COMPONENTES Y SU EFECTO SOBRE ENFERMEDADES VASCULARES.

PRIMER AUTOR Y FECHA DE PUBLICACION	ESTUDIO	PARTICIPANTES MEDIA DE EDAD SEXO	TIEMPO DE ESTUDIO	DIETA MEDITERRÁNEA O COMPONENTES DE LA MISMA	¿EVENTO VASCULAR?	VARIABLES ANALIZADAS	RESULTADOS
Olga Castañer 2011	EFFECTO DE LOS POLIFENOLES DEL AO SOBRE LOS ANTICUERPOS DE LDLox	182 ♂ 20-60 AÑOS	5 SEMANAS	DiM +AO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES	SANOS	CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE ANTICUERPOS DE LDLox	LOS POLIFENOLES DEL AO AUMENTAN LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS DE LDLox
Jordi Salas-Salvadó 2011	REDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS II CON LA DiM	418 ♂ 55-80 AÑOS ♀ 60-80 AÑOS	4 AÑOS	DiM + AOVE DiM+ FRUTOS SECOS DIETA CONTROL BAJA EN GRASAS	ELEVADO RIESGO CARDIOVASCULAR Y DE PADECER DIABETES TIPO II	CONTROL GLUCÉMICO	LA DiM PREVIENE LA APARICION DE DIABETES MELLITUS TIPO II EN PERSONAS CON ELEVADO RIESGO CARDIOVASCULAR
Mireia Urpi-Sarda 2012	ASOCIACIÓN PLASMÁTICA DE TNFR60 Y DM	516 ♂ 54-79 AÑOS ♀ 58-79 AÑOS	1 AÑO	DiM + AOV DiM+ FRUTOS SECOS DIETA CONTROL BAJA EN GRASAS	ELEVADO RIESGO CARDIOVASCULAR	TNFR60 TNFR80 IL-6, e ICAM-1	LA DiM REDUCE LA CONCENTRACIÓN EN PLASMA DE MARCADORES TUMORALES ASOCIADOS A LA ATROSCLEROSIS
Olga Castaner 2012	PROTECCION DE LA OXIDACION DEL LDL POR LOS POLIFENOLES DEL AOV	180 ♂ 20-60 AÑOS	5 SEMANAS	SUPLEMENTO DE POLIFENOLES A DISTINTAS DOSIS	SANOS	CD40L LDLox IL23A ADRB2	REDUCCION DE LA EXPRESION DEL GEN CD40 REDUCCION DE LA OXIDACION DE LDL
Estefanía Toledo 2013	EFFECTO DE LA DiM SOBRE LA PRESION ARTERIAL	7158 ♂ 55-80 AÑOS ♀ 60-80 AÑOS	4 AÑOS	DiM + AOV DiM+ FRUTOS SECOS DIETA CONTROL BAJA EN GRASAS	ELEVADO RIESGO CARDIOVASCULAR	PRESION ARTERIAL	LA DiM TIENE EFECTOS BENEFICIOSOS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

Guasch-Ferré Marta 2013	ESTUDIO SOBRE LA ASOCIACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE CONSUMO DE FRUTOS SECOS Y LA MORTALIDAD EN INDIVIDUOS CON ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR	7216 ♂ y ♀ 55-80 AÑOS	4.8 AÑOS	DiM + AOV DiM+ FRUTOS SECOS DIETA CONTROL BAJA EN GRASAS	ELEVADO RIESGO CARDIOVASCULAR	NUMERO DE MUERTES DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO POR EFERMEDAD CARDIOVASCULAR	ELCONSUMO DE FRUTOS SECOS DISMINUYE LA FRECUENCIA DE MUERTES EN INDIVIDUOS CON ELEVADO RIESGO CARDIOVASCULAR EN UNA POBLACION ESPAÑOLA
Dirk W Droste 2013	ASOCIACIÓN INGESTA MODERADA DE VINO TINTO Y ATEROSCLEROSIS CAROTÍDEA	108 ♂36 ♀72 37-80 AÑOS	20 SEMANAS	DiM VINO TINTO	PACIENTES CON ATEROSCLEROSIS CAROTIDEA	RELACIÓN ENTRE LDL/HDL	LDL SE REDUJO SIGNIFICATIVAMENTE CON LA DiM
Martin de Bock 2013	POLIFENOLES DE HOJA DE OLIVO Y SENSIBILIDAD A LA INSULINA	46 46.4 +/- 5.5 AÑOS ♂100%	30 SEMANAS	EXTRACTO DE HOJA DE OLIVO	ALTO RIESGO DE SUFRIR SINDROME METABÓLICO SOBREPESO	SENSIBILIDAD A LA INSULINA (MÉTODO DE MATSUDA).	MEJORA DE LA SENSIBILIDAD A INSULINA Y DE LA CAPACIDAD DE RESPUESTA DE LAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS
Ramón Estruch 2013	LA DiM PREVIENE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	7447 50 a 80 años ♀ 57%	6 AÑOS	DiM +FRUTOS SECOS DiM+AOVE DIETA CONTROL BAJA EN GRASAS	ALTO RIESGO DE SUFRIR UN EVENTO CARDIOVASCULAR	ANALISIS DE LA SUPERVIVENCIA mediante el estimador Kaplan-Meier (Št)	DISMINUCIÓN DE LA INCIDENCIA DE EVENTO CARDIOVASCULAR ASOCIADA AL CONSUMO DE LA DiM SUPLEMENTADA CON AOVE O FRUTOS SECOS

RJ Widmer 2013	EFFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS POLIFENOLES	82 ♂ y ♀ ≥ 18	16 SEMANAS	POLIFENOLES DEL ACEITE DE OLIVA + PPAL POLIFENOL DEL TÉ VERDE (Galato de epigallocatequina)	ATEROSCLEROSIS TEMPRANA (PRESENCIA DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL)	MEDIDA DE LA FUNCION ENDOTELIAL MEDIANTE tonometría arterial (RH-PAT)	MEJORA SIGNIFICATIVA DE LA FUNCION ENDOTELIAL
Aleix Sala-Vila 2014	ESTUDIO DEL ESPESOR DE LA CAPA INTIMA- MEDIA DE LA CARÓTIDA	164 ♂ 55-80 años ♀ 60-80 años	2,4 AÑOS	DiM +FRUTOS SECOS DiM+AOVE DIETA CONTROL BAJA EN GRASAS	PRESENCIA DE DIABETES + ALGÚN FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR	MEDIDA POR ULTRASONIDO DE LA CAPAS INTIMA -MEDIA DE LA CARÓTIDA	REDUCCION DE LA FORMACION DE PLACA EN CARÓTIDA
Hernández Alvaro 2014	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE HDL tras el CONSUMO DE POLIFENOLES DEL ACEITE DE OLIVA	47 ♂ 20-60 años	5 SEMANAS	DiM	SANOS	DETERMINACION DE LOS POLIFENOLES DEL AO POR HPLC +ESPECTROGRAFÍA DE MASAS MEDIDAS DE HDL	MEJORA DE LA FUNCION DE HDL
Parag R. Gajendragadkar 2014	EFFECTO DEL LICOPENO SOBRE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	72 30-80 años	8 SEMANAS	LICOPENO	ECV	CAMBIOS EN LA VASODILATACIÓN DEPENDIENTE DEL ENDOTELIO DE LA ARTERIA BRAQUIAL	MEJORA DEL ENDOTELIO EN ECV
Guasch-Ferré Marta 2014	EFFECTO DEL ACEITE DE OLIVA SOBRE LA ENFERMEDAD Y MORTALIDAD CARDIOVASCULAR	7216 55-80 años ♂ 55-80 ♀ 60-80	4,8 años	DiM	ELEVADO RIESGO CARDIOVASCULAR	RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO DE AOV CON ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y LA INCIDENCIA DE MUERTE POR ESTA CAUSA.	DISMINUCIÓN DE LA MORTALIDAD EN PACIENTES CON ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR
Martínez- González	EL CONSUMO DE AOV REDUCE EL	6705 55-80		DiM+AOVE DiM+FRUTOS		INFLUENCIA DEL CONSUMO DE	EL CONSUMO DE AOVE REDUCE EL RIESGO DE



Miguel A 2014	RIESGO DE FIBRILACIÓN AURICULAR (FA)	♂ 55-80 ♀ 60-80	4.7	SECOS DIETA BAJA EN OTRAS GRASAS PARA EL GRUPO CONTROL	SANOS	AOVE EN LA APARICION DE FA	APARICION DE FA
Antonio Ceriello 2014	EFFECTO DE LA DiM SUPLEMENTADA CON AOVE EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II	48 ♂ ♀ >18 años	12 SEMANAS	DiM + AOVE	DIABÉTICOS TIPO II	EFFECTOS SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO	MEJORA DE LA RESISTENCIA DEL ENDOTELIO A LA ACCIÓN DE GLP-1
Nancy Babio 2014	DiM Y SINDROME METABÓLICO	5801 ♂ 55-80 años ♀ 60-80 años	+ 4,8 AÑOS	DiM + AOVE DiM+ FRUTOS SECOS DIETA BAJA EN GRASAS	ELEVADO RIESGO CARDIOVASCULAR	RIESGO DE DESARROLLAR SINDROME METABÓLICO	LA DiM RETRASA LA APARICION DEL SINDROME METABÓLICO
Jordi Mayneris-Perxachs 2014	RELACIÓN SINDROME METABÓLICO Y DiM	424 175 ♂ 55-80 AÑOS 249 ♀ 60-80 AÑOS	1 AÑO	DiM + AOVE DiM+ FRUTOS SECOS DIETA BAJA EN GRASAS	DIABETES MELLITUS TIPO II O TRES FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	NIVELES DE ACIDOS GRASOS EN PLASMA	LA DiM BENEFICIA A LOS PACIENTES CON SINDROME METABÓLICO
Hannah Gardener 2014	RELACIÓN ENTRE LA DiM, con EL ESPESOR Y ÁREA DE LA ARTERIA CARÓTIDA	1374 66 +/- 9 años ♂ 40% ♀ 60%	8 AÑOS	DiM	SANOS	GROSOR Y ÁREA DE LA CAPA ÍNTIMA-MEDIA CAROTÍDEA (CIMT) MEDIANTE ULTRASONIDOS.	MODERADA REDUCCIÓN DE LA PLACA ARTEROCLERÓTIDA CAROTÍDEA ASOCIADA AL CONSUMO DE LA DiM
Rosa Casas 2014	EFFECTOS DE LA DiM EN LA INFLAMACIÓN DE LA PARED VASCULAR	164 ♂ 55-80 años ♀ 60-80 años	1 AÑO	DiM SUPLEMENTADO CON 50 mL / día DE AOVE (AOVE DiM +) O 30 G / D DE FRUTOS SECOS (NUECES DiM +) Y UNA	ALTO RIESGO DE SUFRIR UN EVENTO CARDIOVASCULAR	NIVELES DE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS	LA DiM SUPLEMENTADA CON AOVE O FRUTOS SECOS PREVIENE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

				DIETA BAJA EN GRASA.			
Rachel H.X. Wong 2014	EFFECTO ANTIHIPERTENSIVO DE LA COMBINACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJA DE OLIVO, GRANO DE CAFÉ Y REMOLACHA	37 18- 80 años ♀17%	16 SEMANAS	EXTRACTO DE HOJA DE OLIVO EXTRACTO DE GRANOS DE CAFÉ VERDE Y POLVO DE REMOLACHA	SANOS	PRESIÓN ARTERIAL	LA COMBINACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJA DE OLIVO, GRANO DE CAFÉ Y REMOLACHA NO DIO RESULTADOS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL
G.Chiva-Blanch 2014	EFFECTOS DEL ALCOHOL Y LOS POLIFENOLES DE LA CERVEZA SOBRE LA ATROSCLEROSIS	33 55 y 75 años ♂100%	4 SEMANAS	CONSUMO MODERADO DE ALCOHOL POLIFENOLES DE LA CERVEZA	ELEVADO RIESGO CARDIOVASCULAR	ÓXIDO NÍTRICO (NO) GLUCOSA EN SANGRE, COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS, CLORURO DE MAGNESIO, HOMOCISTEÍNA Y VITAMINA B12. BIOMARCADORES DE LA INFLAMACIÓN	EL CONSUMO MODERADO DE CERVEZA CON o SIN ALCOHOL, DISMINUYE EL RIESGO DE ENFERMEDAD VASCULAR

Kevin C. Maki 2015	COMPARACION DE ACIDOS GRASOS POLIINSATURADO DEL MAIZ CON ACIDOS GRASOS MONOSATURADO DEL AOVE SOBRE LOS NIVELES DE COLESTEROL	57 18-74 años 65% mujeres	8 SEMANAS	CONSUMO DE ACEITE DE MAIZ CONSUMO DE AOVE	NIVELES ELEVADOS DE COLESTEROL	LIPIDOS PLASMÁTICOS	EL CONSUMO DE ACEITE DE MAIZ REDUCE LA HIPERCOLESTERONEMIA SIGNIFICATIVAMENTE, SIENDO MAYORES EN EL C TOTAL, LDL-C, Y NO HDL-C EN COMPARACIÓN CON AOVE.
Hernández Álvaro 2015	POLIFENOLES DEL AO	25 ♂ 20-59 años	5 SEMANAS	CONSUMO DE AO CON BAJO Y ALTO CONTENIDO EN POLIFENOLES	SANOS	[ Apo B-100] [LDLTOTALES] [LPL] (solo se midió en 18 hombres)	EL CONSUMO DE POLIFENOLES DEL AO DISMINUYE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE Apo-B100, LDL y LPL además disminuye la aterogenicidad de LDL
Courtney R. Davis 2015	COMPARACION DM CON DIETA AUSTRALIANA EN ADULTOS SANOS	166 ♂ y ♀ ≥ 65	24 SEMANAS	DiM	SANOS	LIPIDOS PLASMÁTICOS, GLUCOSA EN SANGRE, PRESIÓN ARTERIAL	COLESTEROL TOTAL LDL, TRIGLICÉRIDOS Y GLUCOSA HAN DISMINUIDO EN AMBOS GRUPOS, CON UNA TENDENCIA A UNA MAYOR DISMINUCIÓN EN EL GRUPO DE DiM
Silva Sandra 2015	EFFECTO DEL APOORTE DE AOV CON BAJA O ALTA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS SEGÚN GRUPO, EN BIOMARCADORES PROTEÓMICOS URINARIOS	63 27♂ y 36 ♀ 18-75	6 SEMANAS	SUPLEMENTO DE ACEITE DE OLIVA CON ALTA O BAJA CONCENTRACIÓN DE FENOLES(AOVE)	SANOS	COLESTEROL TOTAL LDL, LDL ox, HDL TRIGLICÉRIDOS Y GLUCOSA. COMO MARCADOR DE GLICACIÓN DE PROTEINAS SE MIDIÓ LA CONCENTRACION EN PLASMA DE FRUCTOSAMINA	EL APOORTE EN LA DIETA DE AO DURANTE 6 SEMANAS NO CONDUCE A UNA MEJORA EN LOS NIVELES DE BIOMARCADORES CARDIOVASCULARES EN INDIVIDUOS SANOS

Verhoeven Veronique  2015	ESTUDIO DEL PERFIL LIPIDICO	50  ♂ y ♀ ≥ 18	8  SEMANAS	EXTRACTO DE ACEITE DE OLIVA + LEVADURA DE ARROZ	SINDROME METABÓLICO	MEDIDA DE LDL, CH, HDL, ApoA1, ApoB, HbA1, oxLDL	REDUCCION DE LOS NIVELES DE LDL
Fernandez- Castillejo Sara  2016	ESTUDIO DE LOS POLIFENOLES DEL AO SOBRE LAS LIPOPROTEINAS	33	5  SEMANAS	POLIFENOLES DEL ACEITE DE OLIVA	HIPERCOLESTERO L TC> 200mg/dL	LDL Y HDL	REDUCCION DE LOS NIVELES DE LDL Y HDL
Boss Anna  2016	ESTUDIO DEL EFECTO DE EXTRACTO DE HOJA DE OLIVO, SOBRE LA REGULACION DE GENES QUE INTERVIENEN EN LOS PROCESOS DE LA INFLAMACION	29	8  SEMANAS	EXTRACTO DE HOJA DE OLIVO	SANOS	EFECTO SALUDABLE DE LOS POLIFENOLES EN LA EXPRESION DE GENES DE LA INFLAMACION	INFLUENCIA FAVORABLE EN LA REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES ESTUDIADOS
Rosa Casas  2016	EFECTO INMUNOMODULAD OR A LARGO PLAZO DE LA DM EN PACIENTES CON ELEVADO RIESGO DE EVENTO CARDIOVASCULAR	160  50 % ♂ y ♀	3-5 AÑOS	DiM +AVOE DiM+FRUTOS SECOS GRUPO CONTROL CON DIETA BAJA EN GRASAS	ALTO RIESGO DE PADECER EVENTO CARDIOVASCULAR	MARCADORES INFLAMATORIOS	DISMINUCION DE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS Y MOLECULAS DE ADHESION REDUCCION SIGNIFICATIVA DE EVENTO CARDIOVASCULAR
Imamura Haruki  2017	EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA PRESION ARTERIAL	50	12  SEMANAS	SUPLEMENTO DE RESVERATROL EN LA DIETA	PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2	EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA RIGIDEZ ARTERIAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO	REDUCCION DE LA PRESION ARTERIAL Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Ana Arpón 2017	INFLUENCIA DE LA DiM ENRIQUECIDA CON NUECES O AOVE SOBRE LA METILACION DEL DNA	36	5 AÑOS	DiM +AOVE DiM+FRUTOS SECOS GRUPO CONTROL CON DIETA BAJA EN GRASAS	ALTO RIESGO DE PADECER EVENTO CARDIOVASCULAR	EFFECTO DE LA DM ENRIQUECIDA CON NUECES O AOVE SOBRE LA METILACION DEL DNA DE LOS GLOBULOS BLANCOS	LA DiM ENRIQUECIDA CON NUECES O AOVE, INDUCE CAMBIOS EN LA METILACION DEL DNA EN ESTAS CÉULAS CON UN EFECTO BENEFICIOSO SOBRE LA SALUD
Yubero-Serrano EM 2020	COMPARACION DE LA DiM CON UNA DIETA BAJA EN GRASA SOBRE EL EFECTO EN LA FUNCION ENDOTELIAL	805 ♂ y ♀ entre 20-75 años	1 AÑO	DiM y DIETA BAJA EN GRASAS	ENFERMEDAD CARDÍACA	CAPACIDAD DE DILATACIÓN DEPENDIENTE DEL ENDOTELIO DE LA ARTERIA BRAQUIAL, DILATACIÓN MEDIADA POR FLUJO (FMD)	LA DiM, MEJORA LA FUNCION ENDOTELIAL



## 1.2 Los compuestos fenólicos: la clave del efecto beneficioso de la DiM y el AOVE

El aceite de oliva (AO) contiene mayoritariamente triglicéridos, pero su importancia sobre la salud radica en esa pequeña fracción minoritaria, alrededor del 2% del peso, por lo que podemos decir que, aunque esta fracción sea una pequeña parte de su composición total supone por el contrario una elevada variabilidad de compuestos químicos y de estos son los componentes fenólicos los de mayor variedad, desde fenoles de bajo peso molecular, ácidos fenólicos, difenoles, hasta polifenoles complejos y de elevado peso molecular.

Los constituyentes menores podemos dividirlos en 2 grupos: aquellos derivados de ácidos grasos tales como ceras, esteres de esteroides y fosfolípidos y aquellos compuestos químicos no relacionados directamente con ácidos grasos, como los alcoholes alifáticos, ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, secoiridoides, tocoferoles, clorofilas (responsable del color verde del aceite) y carotenoides (responsable del color amarillo) entre otros.

Existen también dentro de los compuestos secoiridoides, que son iridoides de estructura abiertas, formas glucosiladas, las más importantes en el AO son la oleuropeína y lugostrósido ambos derivados de esteres del ácido elenólico como 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosol) y 2-(4-hidroxifenil) etanol (tirosol), respectivamente (Ghanbari, et al., 2012; Soler-Rivas, et al., 2000).

El compuesto del AO que sin duda más interés ha suscitado es un alcohol fenólico, el Hidroxitirosol (HT) o 3,4-dihidroxifeniletanol, cuantiosos estudios avalan que este compuesto inhibe la oxidación de las LDL adquiriendo por esto capacidad cardioprotectora, así como su efecto protector frente a la apoptosis de las células que forman el endotelio. Los compuestos derivados secoiridoides presentes en el AO, son transformados a tirosol e hidroxitirosol por procesos de hidrólisis durante la digestión y absorbidos en el intestino por lo que sus metabolitos estarán presentes posteriormente en el plasma sanguíneo (Fitó et al., 2007; Rubió et al., 2012).

La concentración de estos polifenoles varía entre 200 y 1000 mg/kg, y va a depender de un gran número de factores tales como: la variedad de la aceitunas, el grado de maduración de las mismas, del tipo de extracción y filtración, de las prácticas agrícolas

y de factores medioambientales. La dosis diaria recomendada para HT que debemos tomar estaría en aproximadamente 7 mg/día (Rodríguez-Morató et al., 2015).

Los numerosos efectos biológicos de los compuestos fenólicos del AO, responsables en gran medida de las propiedades saludables del aceite de oliva han sido avalados por múltiples estudios, de entre ellos destacar PREDIMED y EUROLIVE (ver más adelante).

Los compuestos fenólicos del AO, oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol son eficaces antioxidantes y capturan de una manera notable los radicales libres (Tucks y cols., 2002). Además, contribuyen a equilibrar el incremento del estrés oxidativo por una parte y por otra corrige el efecto antioxidante que está alterado afectando a la función de la capa endotelial lo que hace progresar la enfermedad aterosclerótica.

Existe una estrecha unión entre el estrés oxidativo y la función endotelial, que está alterada en modelos animales de experimentación de diabetes, aterosclerosis, hipertensión, hipercolesterolemia (Ohara y cols., 1993; Keaney y cols., 1995; Cai y Harrison, 2000). Un medio con niveles elevados de  $O_2$  contribuye a una escasa biodisponibilidad del NO, esto sucede en la pared de las arterias como una constante biológica cuando se dan estas premisas. La disfunción del endotelio puede ser corregida en pacientes a través de la administración de sustancias capaces de capturar los radicales libres de  $O_2$  (Ting y cols., 1997; Levine y cols., 1996; Heitzer y cols., 1996; Jackson y cols., 1998).

La concentración de compuestos fenólicos del AO causa un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico del plasma sanguíneo, en comparación con la concentración de ácido monoinsaturado (Covas, 2008). El AO con un alto contenido en fenoles (366 mg/Kg) incrementa la HDL además de reducir el grado de triglicéridos (TG) en comparación con AO con polifenoles a baja concentración (Covas y cols., 2006a)

Se ha demostrado en los estudios de EUROLIVE, que el AOVE que es el que posee una mayor concentración de polifenoles, reduce el deterioro oxidativo de los lípidos en una proporción mucho mayor que otros tipos de aceites (Covas y cols., 2006a). Existe una correlación entre el daño o deterioro oxidativo y la inflamación, ambos a su vez están en estrecha concordancia con la disfunción endotelial.

Efectivamente, la causa más notable de la disfunción endotelial en la hipertensión es que la disponibilidad de NO disminuye. Además, el estrés oxidativo por causa de la formación del anión superóxido hace que disminuya la disponibilidad de NO y se inhibe la expresión del enzima óxido nítrico sintasa (NOs) por las LDL oxidadas. Por lo tanto, la reducción de las LDL oxidadas favorecería la disminución de la presión arterial como expresan los resultados del estudio de Fitó y cols. (2007 a, b). También cabe decir que la oxidación de las LDL es inhibida por oleuropeína e hidroxitirosol compuestos fenólicos del AO (Caruso, et al., 1999; Fitó, et al., 2000; Visioli & Galli, 1998b).

Bajas concentraciones de hidroxitirosol y ácido oleico son una excelente combinación en el AO, ya que inhibe la adhesión de los monocitos al endotelio, circunstancia que acontece con concentraciones en el rango de micromolar (Carluccio, et al., 1999, 2003; Dell'Agli, et al., 2006). La cantidad necesaria para alcanzar el efecto comentado anteriormente, concentración en plasma, puede alcanzarse con el consumo de polifenoles asociado a la DiM (Visiers y cols., 2002).

Desde una perspectiva farmacológica, es en el HT donde se concentran los efectos beneficiosos sobre la salud asociados al AOVE. El grupo de investigación donde se ha llevado a cabo esta tesis se centra en las características farmacológicas de este compuesto sobre las enfermedades cardiovasculares.

El HT, es un polifenol que está presente en numerosas fuentes naturales, especialmente en el olivo. El contenido de HT es superior en las hojas que en los frutos del olivo y en este es concretamente en el mesocarpio de la aceituna donde se concentra. A partir de las hojas puede ser aprovechado y extraído con mayor rendimientos mediante extractos metanólicos (Ryan, et al., 2003).

El HT se encuentra en el AOVE en dos formas: en forma libre o en forma de éster, contribuyendo en un 70 - 80% a la fracción fenólica total (M. Ruiz, 2013).

El HT ha sido descrito como uno de los antioxidantes más sólidos presentes en el AO. Se caracteriza por presentar multitud de acciones biológicas como son: actividad antimicrobiana, antihipertensiva, hipoglucémica, protege del daño oxidativo, antiagregante plaquetaria, cardioprotectora y antiinflamatoria (Visioli et al., 2002a; Tuck & Hayball, 2002a; Bianco & Ramunno, 2006; Covas et al., 2006a y b; Bendini y cols., 2007; Reyes, et al., 2013; Covas, et al., 2015), aparte de inhibir la proliferación y

promover la apoptosis en numerosas líneas celulares tumorales humanas (Fabiani et al., 2009).

La eficacia antioxidante abarca más efectos: antiinflamatorios, antiateroscleróticos, , antimutagénicos, anticarcinogénicos, moduladores hormonales, inmunomoduladores y antidiabéticos (Cicerale et al., 2010; Hu, et al., 2014).

El HT tiene propiedades antiaterogénicas, gracias a su efecto sobre radicales libres los más destacados son el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso. Además, presenta un importante efecto quelante sobre metales (hierro), disminuyendo la aparición de más radicales libres (derivado de reacciones asociado con este metal). Esta característica le otorga un importante papel en la aterosclerosis, patología que se caracteriza por la entrada de moléculas de LDLox en el interior de la íntima arterial. Previene la oxidación de estas lipoproteínas por macrófagos, aumentando la capacidad antioxidante en los macrófagos (que presentan bajos niveles de glutatión) (Granados-Principal, et al., 2010a).

Las especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) que producen los neutrófilos y otras células fagocíticas son neutralizados por el HT. Otros compuestos, presentes también en el AO, poseen acción antioxidante: escualeno, ácido oléico, tirosol y los tocoferoles. La ingesta en la dieta de los polifenoles del AO reducen el riesgo de enfermedades mediadas por ERO y justifica el efecto beneficioso de la DiM sobre la salud humana (Antonio Moreno et al., 2003).

Aparte de prevenir la oxidación de LDL, el efecto beneficioso a nivel cardiovascular de HT se debe a la reducción en la expresión de moléculas de adhesión a células endoteliales, así como una inhibición de los factores de transcripción de la vía inflamatoria

El HT además disminuye y se ha comprobado, el riesgo de sufrir enfermedades como la aterosclerosis y enfermedad coronaria (Grignaffini, et al., 1994; Salami, et al. , 1995; Bitler, et al., 2005; Fitó et al., 2007; Rafahi et al., 2012; Rafahi, et al., 2012;).

Varios estudios han analizado los efectos de HT sobre los lípidos en sangre, el estado antioxidante y la sucesión de las lesiones en la aorta. En uno de estos estudios se utilizaron conejos con elevada concentración de lípidos en sangre (hiperlipémicos), que

fueron alimentados con una dieta control que contenía aceite de girasol, una dieta aterogénica alta en grasas saturadas y colesterol, y una dieta con HT, respectivamente. Los grupos HT mejoraron su estado antioxidante y disminuyeron el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en comparación con los animales control, por lo que concluyeron que una dieta sana suplementada con HT tenía efectos cardioprotectores *in vivo* (González-Santiago et al., 2006).

El HT ejerce además un efecto beneficioso sobre la actividad de las plaquetas, reducen *in vitro* la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares (Carluccio et al., 2007) o impiden *in vivo* la agregación plaquetaria en ratas (González-Correa et al., 2009; González-Correa, et al., 2008). También en estudios efectuados en población humana, se ha relacionado el HT y derivados con la mejoría del perfil hemostático postprandial trombogénico de FVIIa y PAI-1 (Ruano et al., 2007)

En la aterosclerosis y en enfermedades cardiovasculares desempeña un importante papel la inflamación en sí y sus consecuencias, los polifenoles como se ha demostrado en estudios epidemiológicos y en estudios de animales disminuyen la producción de marcadores inflamatorios como son las citoquinas y el NO (Bernini et al., 2013; Richard et al., 2011).

Gracias a su elevado potencial antioxidante el HT reduce el riesgo de padecer enfermedad coronaria, debido a que moléculas que son fundamentales para la actividad del endotelio tales como: E-selectina y moléculas de adhesión a monocitos, las ICAM-1 y VCAM-1, todas ellas están íntimamente relacionadas con los procesos de inflamación y poseen además características antiagregantes (Dell’Agli et al., 2006; Caterina Manna, Napoli, Cacciapuoti, Porcelli, & Zappia, 2009).

El tratamiento con HT y resveratrol (compuesto presente en las uvas y por ende en el vino) disminuyen que se exprese el ARNm asociado a la VCAM-1 gracias a que provoca el bloqueo de la activación de diversos factores de la transcripción NF-kB y AP-1, que regulan de forma directa la expresión de compuestos proinflamatorios así como la expresión de genes proaterogénicos según demostraron (Carluccio et al., 2003).

Sobre la función plaquetaria también se ha demostrado sus beneficios muy ligada a la inflamación, se demuestra que inhibe la agregación por inducción química, en suero

humano la acumulación del pro-agregante TxB<sub>2</sub>, la síntesis de moléculas previas a la inflamación, de leucotrienos y la actividad de la lipoxigenasa araquidonato.

En experimentos *in vitro* se ha puesto de manifiesto que HT inhibe la agregación plaquetaria, la concentración de tromboxano, la síntesis de leucotrienos y araquidonato lipooxigenasa (Visioli & Galli, 2002; González-Correa et al., 2009; González-Correa, et al., 2008).

Los innumerables estudios y modelos de experimentación habían dejado patente la efectividad y validez del HT. Desde el punto de vista de la farmacología se hace inevitable establecer una unión entre la farmacocinética (cuál es la concentración de una sustancia que estando presente en el organismo está disponible) y su farmacodinamia (cuáles son sus efectos en base a esa disponibilidad) en el humano.

Existen diversos estudios que ponen en valor esta relación farmacocinética-farmacodinámica en el organismo humano.

Fue en el año 2000 cuando aparecen las primeras evidencias de la absorción del HT (Visioli et al., 2000), el estudio llevó a cabo la administración de diferentes aceites de oliva con diferentes concentraciones de fenoles, como el HT y el tirosol, estos compuestos fueron hallados y medidos en muestras de orina y la cantidad que se obtuvo iba en concordancia con la cantidad de los mismos en el aceite administrado, es decir la excreción de HT fue superior en AOVE, que en aquellas muestras obtenidas cuando el tratamiento era con aceite enriquecido con compuestos fenólicos y también cuando fue ingerido junto a otros alimentos, por ejemplo en el yogurt enriquecidos con estos mismos compuestos fenólicos (Visioli et al., 2003).

También se detectó tirosol e HT en algunas ocasiones, en lipoproteínas plasmáticas tras la ingestión de 100 mL de AO (Bonanome et al., 2000).

Un estudio también del año 2000 demostró que el transporte de HT se producía por mecanismos de difusión pasiva y en ambas direcciones. Se calculó el coeficiente de permeabilidad aparente y este indicó que el HT se absorbe a nivel intestinal (Manna et al., 2000).

En el 2003, Miro-Casas et al., llevan a cabo un método de análisis para HT y 3-O-metil-hidroxitirosol en el plasma sanguíneo. Tras 12 horas desde la administración de 25 mL

de AOVE se obtuvieron las muestras de orina y plasma, dando como resultado que aproximadamente el 98% del HT está presente en dichas muestras de manera conjugada (Miro-Casas et al., 2003). La dosis administrada era análoga a la que se utiliza de forma habitual en los países de la vertiente mediterránea.

En relación con la seguridad-toxicidad de los polifenoles del AO, un estudio sobre HT y su biodisponibilidad oral, puso de manifiesto una asociación entre el HT ingerido y su glucurónido y la excreción a través de la orina de estos compuestos. Además se comprobó que el consumo de HT es seguro a concentraciones de 20 mg /Kg/día (Soni, et al., 2006).

La biodisponibilidad de tirosol e HT y su absorción en humanos está comprendida entre 55 a 66 % moles y su excreción en orina está en torno al 5%. Podemos plantear que 50 g de AO/día se proporcionan unos 2 mg (13  $\mu$ moles) de HT/día, que se traducirían en una plasmática de fenoles de 0,06  $\mu$ mol/L. El empleo de AOVE con alto contenido en polifenoles, acercaría la concentración plasmática a niveles entre 50-100  $\mu$ moles y que son los niveles requeridos para alcanzar un efecto antioxidante *in vitro* (Vischers, et al., 2004).

Mención especial merece los estudios realizados sobre la población del ensayo clínico aleatorizado, cruzado EUROLIVE (Covas., et al.), realizado entre septiembre de 2002 y junio de 2003, en la que participaron cinco países europeos (España, Italia, Alemania, Dinamarca y Finlandia,), con la colaboración de 200 varones sanos de las cuales 182 participantes completaron el seguimiento. Se dividieron en tres grupos según los compuestos que iban a tomar: 25 mL/día de AO con diferente contenido fenólico; AO con alto contenido fenólico (366mg/kg), con contenido fenólico intermedio (164 mg/kg) y con bajo contenido fenólico (2,7 mg/kg). Los resultados obtenidos fueron una disminución en el índice colesterol total / colesterol LDL, así como en los niveles del índice colesterol LDL /colesterol HDL, además de un aumento de los índices de colesterol HDL y una disminución progresiva en los biomarcadores oxidativos que se relacionaron con la concentración de los compuestos fenólicos del AO.

### **1.3. Papel de los polifenoles del AOVE sobre la angiopatía diabética**

La diabetes mellitus es la endocrinopatía con más prevalencia en el mundo, llegando a un 6.1% de la población mundial (Collaboration NCDRF, 2016).



La diabetes mellitus es uno de los principales factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, aumentando la incidencia de eventos cardíacos, cerebrales o arteriales periféricos (Rask-Madsen et al, 2013).

La base del tratamiento de esta enfermedad es mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de los límites encontrados en la población no diabética. Sin embargo, las complicaciones de la diabetes son comunes y surgen de un control metabólico deficiente (hiperglucemia e hipoglucemia) o niveles altos prolongados de glucosa en sangre, lo que lleva al desarrollo de complicaciones vasculares diabéticas como macroangiopatía y microangiopatía.

Los mecanismos de la vasculopatía diabética están relacionados con el exceso crónico de glucosa en sangre, que causa cambios metabólicos intracelulares que involucran la vía de los poliol, la vía biosintética de la hexosamina, la diacilglicerol-proteína quinasa C, los productos finales de la glicación y la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros mecanismos (Roberts and Porter, 2013). El estrés oxidativo activa otras vías citotóxicas y la formación de ROS se considera el primer paso bioquímico en el proceso de daño de las células endoteliales en la diabetes mellitus. A partir de entonces, puede aparecer la denominada disfunción endotelial que, a su vez, puede dar lugar a una vasculopatía diabética (de Zeeuw et al., 2015).

Debido a la importancia del estrés oxidativo en el inicio de la disfunción endotelial en la diabetes, un posible enfoque preventivo de la vasculopatía diabética, además de controlar los niveles de glucosa en sangre, puede ser el uso de compuestos antioxidantes (Li et al., 2014). En este sentido, la DiM (rica en antioxidantes) se ha asociado con un mejor control metabólico de la diabetes, así como con una menor incidencia global de eventos cardiovasculares (Lasa et al., 2014; Martínez-González et al., 2015). El AOV juega un papel importante en los efectos beneficiosos de la DiM. El HT, principal polifenol presente en su forma libre en el AOV, ejerce efectos cardiovasculares beneficiosos y se ha asociado con una disminución de la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) y de la agregación plaquetaria, y una menor producción de mediadores inflamatorios, junto con otros efectos (Covas et al., 2015; González-Correa et al., 2009).

La nefropatía diabética es la complicación microangiopática más grave que puede aparecer en la evolución de un paciente con diabetes mellitus. Se calcula que aproximadamente 202 millones de pacientes con diabetes mellitus en todo el mundo sufren algún tipo de lesión renal (Hovind et al., 2001). Si bien en una parte de estos pacientes la nefropatía diabética permanece silente toda la vida (Gnudi et al., 2007), si esta complicación no es bien controlada, el pronóstico en la mayoría de los casos es la diálisis y trasplante renal. Por todo ello, se investigan medios de profilaxis, además del propio control de la hiperglucemia mantenida en la diabetes.

Altas concentraciones de glucosa de forma persistente llegan a alterar la morfología celular renal, fundamentalmente en los glomérulos (Sagoo et al., 2020). A nivel bioquímico son varios los mecanismos implicados en la nefropatía diabética, que coinciden básicamente con los que afectan a la vasculopatía diabética (Sagoo et al., 2020): estrés oxidativo, estrés nitrosativo, inflamación, inducción de mediadores de crecimiento, activación del sistema renina-angiotensina, etc. (Alicic et al., 2017). En la fisiopatología de la vasculopatía y la nefropatía diabética, el estrés oxidativo provocado por la hiperglucemia persistente es uno de los primeros eventos bioquímicos que inician estas lesiones y potencian a las demás vías de daño celular (Sagoo & Gnudi, 2018). Por ese motivo se ha postulado el posible uso de compuestos antioxidantes en la prevención de la nefropatía diabética (Al-Waili et al., 2017).

Se ha estudiado el efecto protector renal del AOVE en algunos modelos de nefropatía experimental, teniendo un papel importante su acción antioxidante (Aparicio-Soto et al., 2016; Ghorbel et al., 2017). Los compuestos polifenólicos del AOVE son los principales responsables de su acción antioxidante, siendo el HT el de mayor importancia (Serreli and Deianam, 2020).

En estudios realizados en un modelos de diabetes experimental tipo 1 se ha demostrado que HT frena la retinopatía (González-Correa et al., 2018) y reduce algunos biomarcadores cardiovasculares (López-Villodres et al., 2016).

Como comentábamos con anterioridad, en la fisiopatología de la microangiopatía, varios factores inciden en la presencia de un estrés oxidativo endotelial intracelular como principal evento bioquímico, además de una hiperglucemia sostenida. La consecuencia es una alteración de la función vascular y por tanto un daño tisular

derivado de esta disfunción, principalmente de tipo isquémico (Shi & Vanhoutte, 2017). Por otro lado, la hiperglucemia crónica también afecta directamente al tejido nervioso, produciendo una neurotoxicidad en los tejidos constituidos por células nerviosas, como el sistema nervioso central, los nervios periféricos o la retina (Rojas et al., 2017).

Por otro lado, como consecuencia de numerosos estudios preclínicos y clínicos, la responsabilidad de este beneficio se centra en varios aspectos, siendo posiblemente el más relevante la mayor ingesta de micronutrientes, respecto a otro tipo de alimentos. Estos micronutrientes incluyen flavonoides y polifenoles (Tresserra-Rimbau et al., 2014). Se ha demostrado que el HT (principal compuesto polifenol del AOV) reduce una serie de factores bioquímicos y / o funcionales reconocidos como participantes clave en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neuronales en la diabetes mellitus experimental, como la agregación plaquetaria y la oxidación de las lipoproteínas LDL, estrés oxidativo, mediadores inflamatorios cerebrales, etc. (López-Villodres, et al., 2016; Reyes et al., 2016).

#### **1.4. Justificación**

El valor de la DiM en la prevención de la enfermedad cardiovascular ha quedado establecido con la publicación del estudio PREDIMED y las distintas variantes del mismo que se vienen publicando en los últimos años (Estruch et al., 2013; Medina-Remón et al., 2015). Y no cabe duda acerca del papel del AOVE en dicho efecto preventivo. En este sentido, el aceite de oliva es más que un aceite monoinsaturado (Pérez-Martínez et al., 2006) debido a su composición rica en micronutrientes y moléculas bioactivas como los compuestos fenólicos, cuyas propiedades biológicas han sido ampliamente estudiadas (Granados-Principal et al., 2010). La fracción fenólica se compone minoritariamente de hidroxitirosol (HT), tirosol (Ty) y sus derivados acetilados, acetato de hidroxitirosilo (Ac-HT) y acetato de tirosilo (Ac-Ty), además de derivados secoiridoideos de HT y Ty, que constituyen la fracción mayoritaria (Martín-Peláez et al., 2013).

En un esquema lógico de investigación, el siguiente paso conceptual sería averiguar qué mecanismos o vías bioquímicas usa el AOVE para ejercer un efecto cardioprotector dentro de la DiM. En 2004 La agencia americana Food and Drugs Administration (FDA) autorizó la difusión de un mensaje en salud en relación con lo recomendable de

una ingesta de 23 g de aceite de oliva al día, reemplazando la misma cantidad de grasa saturada, para prevenir el riesgo coronario (FDA, 2004). Y en 2013, la declaración nutricional aprobada por EFSA sobre la capacidad que confiere la ingesta de 5 mg/día de HT en la prevención de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Mateos et al., 2001). En el estudio multicéntrico EUROLIVE, además de constatarse un descenso de la oxidación lipídica, se observó una relación directa entre la dosis fenólica y el aumento de la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (EFSA, 2012).

En este momento se establece una secuencia investigadora que va desde el estudio del mecanismo de acción del AOVE a nivel cardiovascular hasta la identificación y estudio de los efectos de los distintos componentes (sobre todo los denominados compuestos menores, por la cantidad presente en el AOVE).

Se ha demostrado que la administración de AOVE en un modelo experimental de arteriosclerosis en conejos no solo disminuye significativamente el estrés oxidativo tisular (incluido arterias y corazón) en los animales hiperlipémicos, sino que también reduce la capacidad trombogénica de la pared arterial a varios niveles: disminución de la hiperactividad plaquetaria y la síntesis de tromboxano; disminución de la degradación de prostaciclina endotelial (compuesto antitrombótico endógeno) causada por el estrés oxidativo vascular; reducción de la trombogénesis inducida por el subendotelio arterial de estos animales (De La Cruz et al., 2000a, 2000b).

Estos efectos se reprodujeron en un modelo experimental de diabetes tipo 1 en ratas, demostrándose una reducción de la función plaquetaria, síntesis de tromboxano y freno en la disminución de la producción vascular de prostaciclina y de óxido nítrico. Asimismo, la administración de AOVE a los animales diabéticos redujo en un 50% la intensidad de isquemia retiniana originada por la diabetes (De La Cruz et al., 2010).

A continuación, se planteó la evaluación del principal componente fenólico del AOVE, el hidroxitirosol (HT), como posible responsable del efecto protector cardiovascular:

La función plaquetaria es reconocida como punto principal en la trombogénesis arterial, por lo que es importante que un compuesto de estas características reduzca esta función, tanto a nivel celular como bioquímico. Pues bien, HT y acetato de hidroxitirosilo (Ac-HT) inhiben de forma concentración dependiente la activación plaquetaria en muestras

sanguíneas humanas (González-Correa et al., 2009) y de forma dosis-dependiente tras su administración oral a animales de experimentación (González-Correa et al., 2008). En ambos casos se confirmó el mecanismo descrito para AOVE, es decir, un incremento de la síntesis vascular de prostaciclina y óxido nítrico y una disminución en la síntesis plaquetaria de tromboxano. Por otra parte, se constató un hecho nuevo: la producción de óxido nítrico constitutivo se incrementó en leucocitos y pared arterial, mientras que la producción inducible se redujo en relación directa a una disminución de la producción leucocitaria de interleucina 1 $\beta$ .

Estos efectos, tanto en sangre humana como en animales de experimentación, se reprodujeron con derivados de HT, tales como ésteres y éteres (Muñoz-Marín et al., 2013; Reyes et al., 2013).

Como consecuencia de la macroangiopatía, diabética o no, el daño vascular produce un síndrome isquémico evidente. En este sentido, tanto AOVE, como HT y Ac-HT protegen al tejido nervioso del daño isquémico y de reperusión, tanto *in vitro* como tras su administración oral (Cabrerizo et al., 2013; González-Correa et al., 2008), así como en animales diabéticos en los que el daño isquémico cerebral es mayor (Reyes et al., 2017). Este mismo comportamiento se confirmó con derivados esterificados y eterificados del HT (De La Cruz et al., 2015a; González-Correa et al., 2008; Guerrero et al., 2012; Muñoz-Marín et al., 2012).

Un aspecto importante de estos estudios es la conclusión de que no se puede explicar todo el efecto protector cardiovascular y cerebral solo por el efecto antioxidante de HT, hecho que se postulaba previamente, sino que hay que tener en cuenta un efecto sobre la inflamación tisular y la síntesis de prostanoides y de óxido nítrico. Esta afirmación viene avalada por la demostración de un efecto protector tisular de tirosol (Ty), equiparable al de HT y en ausencia de un efecto antioxidante por parte de Ty (De La Cruz et al., 2015a, 2015b).

Como consecuencia de los efectos observados con el uso de HT, en relación a la disfunción endotelial y trombogénesis, ambos elementos esenciales de la vasculopatía, nos planteamos evaluar el papel de este fenol sobre la microangiopatía en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1.



# OBJETIVOS





## 2. OBJETIVOS

En el mismo instante del diagnóstico de diabetes mellitus, la estrategia fundamental, ya sea tipo 1 o tipo 2, es plantear una serie de medidas encaminadas al mantenimiento de unos niveles de glucemia aceptables. En la diabetes mellitus tipo 1: insulina, ejercicio físico y dieta equilibrada. En la diabetes mellitus tipo 2: antidiabéticos orales, ejercicio físico, dieta equilibrada y control de otros factores de riesgo (sobrepeso, hipertensión, hipercolesterolemia, etc.). Todo ello va encaminado en una doble vertiente: controlar el efecto directo que una hiperglucemia mantenida puede ejercer sobre los tejidos y evitar las complicaciones cardiovasculares a largo plazo.

Una persona con diabetes tipo 1, por muy joven que sea, si no controla sus niveles de glucemia se verá abocada en el transcurso de los años a una serie de alteraciones vasculares que pueden afectar a cualquier sector anatómico, si bien se distinguen tres localizaciones específicas de los pequeños vasos sanguíneos y que son patognomónicas de la diabetes mellitus:

- Terminaciones nerviosas sensitivas, la más precoz: neuropatía diabética.
- Retina, la más frecuente: retinopatía diabética.
- Riñón, la más grave: nefropatía diabética.

Las consecuencias de la retinopatía y nefropatía son quizás más graves que las de la neuropatía, por eso la investigación que versa sobre la prevención de estas complicaciones se centra más en éstas. Obviamente, la principal consecuencia de la retinopatía diabética es la ceguera (primera causa de pérdida de visión en el mundo) y de la nefropatía es el fracaso renal con la necesidad de diálisis y trasplante renal.

Multitud de estudios han demostrado que el control de los niveles de glucemia es el punto fundamental para frenar la aparición de estas complicaciones, incluso evitarlas completamente, pero la realidad clínica es bien distinta: el control de esta metabolopatía debe ser continuo y de por vida, lo cual induce a incumplimientos en esta atención, en algunos casos muy frecuentes y por ende, fáciles de abocar en la microangiopatía diabética. Ya sea en los pacientes con un control deficiente o en aquellos cuya glucemia se mantiene en unos márgenes aceptables, disponer de elementos que ayuden a proteger

los órganos afectados por esta microangiopatía, constituye un foco científico de atención investigadora.

En este sentido, en la fisiopatología del daño vascular originado por la hiperglucemia crónica en la diabetes mellitus, se encuentra como inicio del proceso y potenciador del resto de vías citotóxicas, el estrés oxidativo. Los radicales libres, originados por un exceso de glucosa en el medio intracelular endotelial ponen en marcha el proceso de inflamación vascular y disfunción endotelial, que llevan generalmente a un evento isquémico. Por ello, se han postulado como posibles candidatos para ayudar en la prevención de este tipo de vasculopatía a los compuestos antioxidantes.

A lo largo de los años se han investigado multitud de moléculas con propiedades antioxidantes, si bien la inmensa mayoría de ellas no cumplían un equilibrio beneficio/riesgo adecuado. Por todo ello se volvió la mirada hacia los compuestos naturales y entre ellos los contenidos en la dieta. En este sentido, la dieta tipo mediterránea se ha confirmado científicamente como óptima para la prevención de complicaciones cardiovasculares e incluso de la diabetes tipo 2 (Matínez-Gonzalez et al., 2015). En la dieta mediterránea la fuente de grasas más abundante es el aceite de oliva virgen extra (AOVE), el cual también ha sido identificado como uno de los principales artífices del beneficio de la dieta mediterránea (Nocella et al., 2018).

Desde los primeros momentos se intentó investigar cuál o cuáles eran los compuestos del AOVE responsables de este beneficio, sobre todo a nivel cardiovascular. Una vez desarrollados muchos proyectos de investigación, fueron los componentes menores del AOVE los adjudicatarios de esta responsabilidad y, entre ellos, los compuestos polifenólicos, entre los que destaca el hidroxitirosol (Marcelino et al., 2019).

Debido a todo esto, hidroxitirosol podría ser un compuesto óptimo que cumpliera la premisa de ayudar a la prevención de la microangiopatía diabética. Por ello, nos planteamos este estudio con los siguientes objetivos:

#### Objetivo principal

Evaluar el posible efecto protector retiniano y renal de la administración oral de hidroxitirosol en un modelo experimental de diabetes mellitus similar a la diabetes tipo 1 humana.

### Objetivos secundarios

- Identificar las posibles modificaciones que hidroxitirosol pudiera producir en las variables bioquímicas de estrés oxidativo y nitrosativo en este modelo experimental.
- Valorar si estas modificaciones podrían explicar el posible efecto protector de hidroxitirosol a nivel retiniano y renal.





# METODOLOGÍA



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Material

A continuación, se recoge los materiales y productos utilizados en la realización de la tesis.

Los kits colorimétricos de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico y capacidad antioxidante total, y los kits de inmunoensayo enzimático de 3-nitrotirosina, 8-iso-prostaglandina F<sub>2α</sub> (8-isoprostano) y 8-hidroxi-2-desoxiguanosina se obtuvieron de Cell Biolabs Inc. (Bionova Científica SL, Madrid, España). Los kits colorimétricos de glutatión peroxidasa y glutatión total se obtuvieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Los kits de inmunoensayo enzimático 11-deshidro-tromboxano B<sub>2</sub> y 6-keto-prostaglandina F<sub>1α</sub> (ambos de determinación urinaria) se obtuvieron de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, EE.UU.).

El kit de inmunoensayo de lipoproteínas oxidadas de baja densidad se obtuvo de Abyntec Biopharma S.L., Bizkaia, España.

Los kits de inmunoensayo enzimático de tromboxano B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>), interleucina-1β (IL-1β), 3-nitrotirosina y 6-ceto-prostaglandina F<sub>1α</sub> (6-ceto-PGF<sub>1α</sub>) fueron de GE Healthcare UK (Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido).

Los kits de inmunoensayo enzimático de Mieloperoxida y VCAM-1 fueron de USCN Life Science Inc. (Oxfordshire, Reino Unido).

El colágeno (estudios de agregometría) se obtuvo de Menarini Diagnóstics (Barcelona, España).

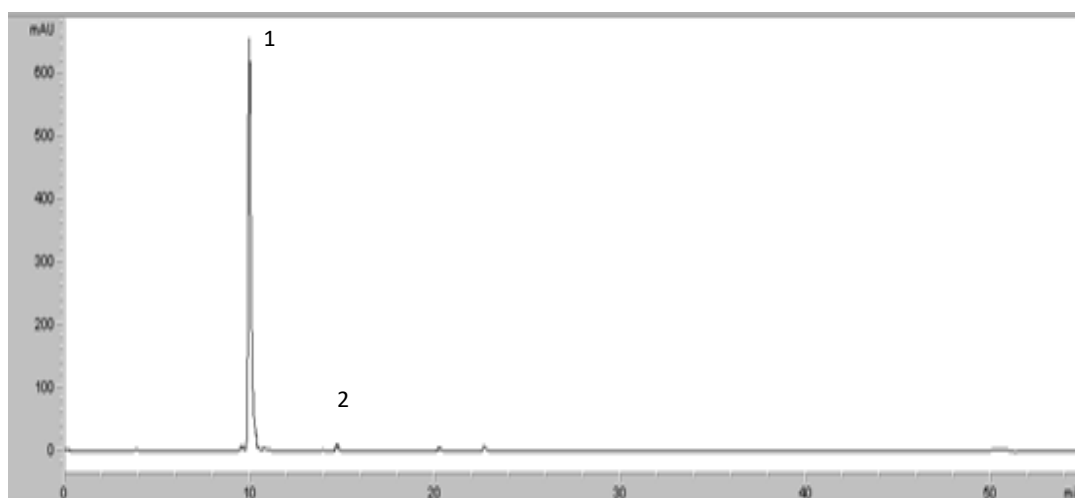
Todos los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO, EE. UU.).

El hidroxitirosol se aisló mediante tratamiento hidrotermal de la fase líquida obtenida del alperujo (un subproducto del sistema de separación de aceite de oliva de dos fases) a 160°C durante 60 min. El líquido se extrajo mediante fraccionamiento cromatográfico



en dos etapas, con un rendimiento final de 99,6% de pureza referida a materia seca, según el proceso descrito por Fernández-Bolaños et al. (2002).

Los fenoles se cuantificaron usando un sistema de cromatografía líquida Hewlett-Packard 1100 con un detector de ultravioleta visible. Se utilizó una columna analítica Mediterránea sea C18 (250 X 4.6 mm d.i.; tamaño de partícula = 5  $\mu$ m) (Teknokroma, Barcelona, España) a temperatura ambiente. El sistema estaba equipado con válvulas de inyección Rheodyne (bucle de 20  $\mu$ L). Las fases móviles fueron ácido tricloroacético al 0,01% en agua y acetonitrilo, con el siguiente gradiente durante un tiempo de ejecución total de 55 min: 95% inicialmente, 75% a 30 min, 50% a 45 min, 0% a 47 min, 75 % a los 50 min y 95% a los 52 min hasta que se completó el ciclo. La cuantificación se llevó a cabo mediante integración de picos a 280 nm de longitud de onda con referencia a calibraciones obtenidas con patrones externos. La Figura 1 muestra un perfil cromatográfico representativo de HT purificado después del tratamiento térmico.



### 3.2. Diseño del estudio

Los experimentos se realizaron con ratas Wistar macho adultas de 2 meses (peso corporal 200-250 g). Todas las ratas se utilizaron de acuerdo con la legislación española vigente para el cuidado, uso y alojamiento de los animales (EDL 2013/80847, BOE-A-2013-6271). Se siguieron las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (publicación del NIH nº 86-23, revisada en 1985), así como la Ley Española de Protección de los Animales en su caso. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética para el Uso de Animales de la Universidad de Málaga

(Ref. CEUMA31-2018-A) y la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Junta de Andalucía (Ref.9 / 07/2019 / 124).

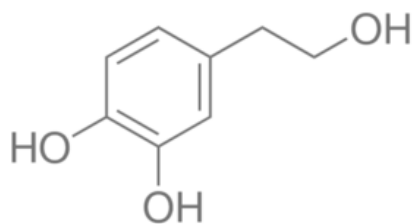
Los animales permanecieron, durante todo el estudio, bajo condiciones estándar de estabulación en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga (Foto1), con condiciones ambientales adecuadas para su manejo: ciclo alternante de luz/oscuridad de 12 h, temperatura ambiente de 22°C. Los animales tuvieron libre acceso a comida y agua.



Foto 1. Sala Centro de Experimentación Animal de la UMA

Los animales (10 ratas por grupo) se distribuyeron en cuatro grupos: 1) ratas control no diabéticas tratadas con solución salina, 2) ratas control diabéticas (DR) tratadas con solución salina, 3) ratas DR tratadas con 1 mg/kg/día p.o. HT y 4) ratas DR tratadas con 5 mg/kg/día p.o. HT. Estas dosis fueron elegidas en base a resultados previos con HT analizando algunos de los biomarcadores cuantificados en este estudio (López-Villodres et al., 2016; Reyes et al., 2016). Se administró hidroxitirosol una vez al día durante 7 días antes de que se indujera la diabetes, y luego todos los días hasta el final del período diabético (2 meses). Se administró hidroxitirosol y suero fisiológico mediante

canulación orogástrica. Los animales fueron pesados 1 vez por semana y se ajustaron las dosis de los tratamientos según el peso.



#### **HIDROXITIROSOL:3,4-dihidroxifeniletanol**

Para causar la diabetes experimental, se utilizó estreptozotocina (Pan Reac. AppliChem. A4272, 0001), en una única dosis de 40 mg/kg disuelta en 1 mL de tampón citrato, administrada por vía intraperitoneal con una jeringa B-D plastipak de 1 mL y aguja 25G 0,5mm x 16mm (Becton Dickinson, Madrid-España). Para la preparación del tampón citrato se precisó realizar previamente dos soluciones: la solución A que contiene ácido cítrico (Panreac, Barcelona, España) 2,1 g/100 ml de agua destilada; la solución B que contiene fosfato sódico (Panreac, Barcelona, España) 2,8 g/100 ml de agua destilada. El tampón citrato resultó de la mezcla de 11,2 ml de la solución A con 8,8 ml de la solución B. Se conservó en el frigorífico a 4°C hasta su uso. Se aconseja tenerlo hecho 24 horas antes. Finalizada la administración, los animales fueron observados periódicamente.

La concentración de glucosa en sangre se midió colocando un glucosímetro FreeStyle (Abbot Laboratories S.A., Madrid, España) en contacto con sangre de la vena safena. Se consideró que los animales eran diabéticos si la glucosa en sangre era superior a 200 mg / dl durante 2 días consecutivos. Las ratas del grupo de control no diabético recibieron una única inyección intraperitoneal intravenosa de solución salina isotónica y se midió la glucosa en sangre de la misma forma que en los animales diabéticos.

Durante el período de seguimiento, los animales diabéticos fueron tratados con 4 UI / día s.c. de un análogo de insulina basal soluble de acción prolongada (Levemir®, Novo Nordisk A / S, Bagsværd, Dinamarca) para reducir la mortalidad debida a los altos niveles de glucosa en sangre. Los animales de control recibieron el mismo volumen de solución salina isotónica s.c.

A lo largo del periodo de seguimiento se cuantificó la cantidad de comida y agua ingeridas a diario. Se determinó el peso de los animales una vez por semana para ajustar la dosis de hidroxitirosol en mg / kg.

Al final del seguimiento, todas las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg / kg i.p.) (Dolethal. Vetoquinol S.A.). Una vez anestesiadas se realizó laparatomía abdominal con el fin de obtener muestra sanguínea (extracción de sangre con jeringa a nivel de la bifurcación de la aorta en las dos arterias ilíacas). Posteriormente los animales fueron decapitados con una guillotina y, por último, se procedió a la obtención de una porción de aorta, ambos riñones y globos oculares.

### **3.3. Técnicas analíticas**

Todas las técnicas se ejecutaron de forma simple ciego, es decir, las personas que realizaron los ensayos desconocían el origen y la naturaleza de las muestras.

#### **3.3.1. Muestras**

En cada animal se obtuvieron las siguientes muestras:

- Sangre total, recogida en tubos sin anticoagulantes y con gel activador de la coagulación. Las muestras se centrifugaron a 3500 x g durante 10 min y se separó el sobrenadante, congelándolo en alícuotas a -80°C hasta el momento de la determinación de las variables correspondientes.
- Sangre total, recogida en tubos con anticoagulantes (citrato sódico 3,8%, proporción 1:10) para la realización de técnica de agregometría.
- Orina. Las ratas fueron introducidas individualmente en jaulas metabólicas modulares (Tecniplast S.p.A., Buguggiate, Italy) y se recogió la orina durante 24 h para el análisis. Se determinó la diuresis total y las muestras fueron centrifugadas a 3500 x g durante 10 min a 4°C, congelando a -80°C en alícuotas hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas correspondientes.



Jaula metabólica modular MC de Tecniplast

- Arteria. Se obtuvo un segmento de la aorta abdominal 0,5 cm anterior a la bifurcación de las arterias femorales. El segmento aórtico se cortó en dos partes y se incubó a 37 ° C en tampón que contenía (mM): 100 NaCl, 4 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2,1 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 citrato de sodio, 2,7 glucosa y 50 Tris (pH 8,3). Los segmentos se colocaron en 500 µl de tampón fresco y se añadieron 10 µl de ionóforo de calcio A23187 (concentración final 50 µM). Treinta minutos después, las muestras se secaron y pesaron y el sobrenadante se congeló a -80 ° C hasta el ensayo.

- Riñones. Se realizó una perfusión de ambos riñones con suero salino isotónico mediante canulación de la arteria renal, con el fin de eliminar la sangre en los vasos renales. Posteriormente se pesaron y se procedió a homogeneizar el riñón izquierdo en Phosphate Buffer Saline 50 mM, pH 7.0 (1/15 p/v), centrifugando la muestra resultante a 13000 x g durante 15 min a 4°C, separando el sobrenadante y congelándolo en alícuotas a -80°C hasta el momento de la determinación de las variables correspondientes. El riñón derecho se utilizó para el análisis histológico.

- Retina. Tras la remoción de los globos oculares y limpieza con solución salina, se fijaron con formaldehído al 10% durante 48 horas en suave agitación y a temperatura ambiente, seguido de la fijación e inclusión en parafina siguiendo un protocolo

convencional para posteriormente realizar cortes con un microtomo rotatorio HM 325 (Leica Biosystems, Nussloch GmbH, Alemania).

### 3.3.2. Bioquímica sérica y urinaria

Todos los parámetros bioquímicos fueron analizados utilizando el autoanalizador Atellica®CH de Siemens Healthineers (Erlangen, Germany). La concentración de glucosa se realizó mediante método enzimático utilizando hexoquinasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. La determinación de creatinina se basa en una reacción con ácido pícrico en medio alcalino. Urea se determinó mediante un método enzimático en el que se utiliza ureasa y glutamato deshidrogenasa. Para la determinación de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> se utilizó un multisensor en el cual hay un Electrodo Ión Selectivo (ISE) para el sodio, el potasio y un electrodo de referencia, las determinaciones se realizaron por potenciometría indirecta. Las proteínas totales se determinaron utilizando sulfato cúprico en solución alcalina (método de Biuret). La determinación de albúmina se realizó utilizando púrpura de bromocresol. El pH de la orina se determinó utilizando tiras reactivas comerciales Sysmex® (Sysmex España, S.L., Barcelona Spain), mediante el autoanalizador UC-3500 (Sysmex España, S.L., Barcelona Spain), el pH se mide por fotometría de reflectancia.

El cálculo del Clearance de Creatinina se realizó mediante la siguiente fórmula (Giribabu et al., 2017)

$$\frac{\text{Urine creatinine (mg/dL)} \times \text{urine volume (mL)}}{\text{Serum creatinine (mg/dL)}} \times \frac{1000}{\text{body weight (g)}} \times \frac{1}{1440}$$

Los valores se expresan en mL/min/kg peso corporal.

### 3.3.3. Estrés oxidativo y nitrosativo

El malondialdehído es el principal producto de la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de concentración de peróxido de lípidos en suero y tejido. Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas en suero se midieron como un índice del estado oxidativo causado por los radicales libres. La concentración de 8-isoprostanos urinarios se determinaron como un índice de producción global de estrés oxidativo (Costabile et al., 2015). Se determinó la concentración de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina en suero y

riñón como un índice de daño al DNA por estrés oxidativo. Se determinó la concentración sérica y renal de 3-nitrotirosina como índice de formación de peroxinitritos. Todas estas determinaciones se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante. A continuación, se describen de forma más detallada.

#### *Peroxidación de lípidos en plasma*

Las sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) se midieron como un índice de concentración de peróxido de lípidos en plasma. Las muestras de plasma se incubaron con 500 µl de ácido tiobarbitúrico al 0,5% en ácido tricloroacético al 20%. Las muestras se agitaron y se incubaron a 100°C durante 15 min, luego se centrifugaron a 2000 x g durante 15 min a 4°C. La absorbancia del sobrenadante resultante se determinó por espectrofotometría a 532 nm (FluoStar, BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania). Las muestras en blanco se prepararon de manera idéntica excepto que se incubaron a 4 °C para evitar la producción de TBARS.

#### *3-nitrotirosina plasmática*

Los niveles plasmáticos de 3-nitrotirosina se midieron como un índice indirecto de producción de peroxinitrito.

#### *Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL)*

La oxLDL se midió como uno de los biomarcadores más importantes en las primeras etapas de la enfermedad cardiovascular.

La producción de 3-nitrotirosina y oxLDL se cuantificó con un inmunoensayo enzimático.

### **3.3.4. Capacidad antioxidante**

La concentración de glutatión en suero y riñón, actividad de la glutatión peroxidasa y la capacidad antioxidante total se determinaron como un índice global de la defensa antioxidante. Los tres parámetros se determinaron mediante kits colorimétricos.

### **3.3.5. Agregometría plaquetaria**



La capacidad de agregación plaquetaria en sangre completa se evaluó a 37°C con el método de impedancia eléctrica (agregómetro Chrono-Log 540, Chrono-Log Corp., Haverton, PA, EE. UU.). Se utilizó colágeno (10 µg/ml) como agente inductor de agregación. La intensidad máxima de agregación se determinó como la resistencia máxima entre los dos polos del electrodo obtenida 10 min después de la adición del agonista.

### 3.3.6. Eicosanoides

- *Tromboxano plaquetario B<sub>2</sub>*. Una vez completada la agregación, la muestra de sangre se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min, y el sobrenadante se congeló a -80 ° C hasta que se cuantificó la producción de tromboxano B<sub>2</sub> con un inmunoensayo enzimático.

- *6-keto-prostaglandina F<sub>1α</sub> vascular*. El segmento aórtico se cortó en dos partes y se incubó a 37°C en tampón que contenía (mM): 100 NaCl, 4 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2,1 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 citrato de sodio, 2,7 glucosa y 50 Tris (pH 8,3). Los segmentos se colocaron en 500 µl de tampón fresco y se añadieron 10 µl de ionóforo de calcio A23187 (concentración final 50 µM). Treinta minutos después, las muestras se secaron y pesaron y el sobrenadante se congeló a -80 ° C hasta el ensayo. La producción de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> (metabolito estable de prostaciclina) se cuantificó con un inmunoensayo enzimático.

- Las concentraciones urinarias de *11-dehidro-tromboxano B<sub>2</sub>* y *6-keto-prostaglandina F<sub>1α</sub>* se midieron como un índice de la producción global, incluido el riñón, de tromboxano y prostaciclina. Estas determinaciones se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos del fabricante.

### 3.3.7. Biomarcadores de inflamación

- *Interleucina 1β sérica, mieloperoxidasa y VCAM-1*

Se incubaron dos mL de sangre nativa a 37°C durante 30 min, luego se obtuvo suero después de centrifugar a 2500 x g durante 15 min a 4°C. El suero se congeló a -80 ° C hasta el ensayo. La producción de interleucina 1β, mieloperoxidasa (MPOx) y VCAM-1 se cuantificó con un inmunoensayo enzimático apropiado.

### 3.3.8. Procedimiento morfológico



De cada animal se extrajeron para realizar estudios histológicos: ojos y riñones, se mantuvieron en un tampón de conservación hasta la inclusión en parafina.

### Protocolo para fijar tejidos

Para fijar los tejidos se utilizó formol tamponado al 10% utilizando un buffer fosfato (0,1M, pH= 6,3), se preparan dos soluciones llamadas solución A y B respectivamente

- Solución A: contiene 6,9 g de  $\text{Na H}_2 \text{PO}_4$  diluido en 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada
- Solución B: contiene 28,64 g de  $\text{Na}_2 \text{H PO}_4$  diluido en 800 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Para preparar 1 L de tampón de conservación mezclamos 200mL de A + 700mL de B, medir pH= 6,3, añadir 100 mL de formol puro (37% de pureza, contiene además metanol que favorece una mejor conservación de las muestras). El pH final tras añadir el formol puro será igual a 7. Se pueden mantener los tejidos en este tampón durante un mes, en nevera, pero se recomienda que se procesen cuanto antes.

Previamente a la inclusión en parafina limpiamos los tejidos con PBS.

El riñón lo limpiamos y cortamos trasversalmente obteniendo dos trozos por riñón. En el ojo eliminaremos aquellos tejidos anexos teniendo especial cuidado de no dañar la zona de la retina, no vaciaremos el globo ocular.

Una vez limpio dejamos de nuevo todos los tejidos en el tampón de conservación. Guardamos en nevera hasta la inclusión en parafina.



### Inclusión en parafina

Dejamos en agitación suave los tejidos:

- En el mismo tampón de conservación durante 2 horas
- 30 minutos en agua destilada y fría
- 30 minutos en alcohol de 50°
- 30 minutos en alcohol de 70°
- 30 minutos en alcohol de 96° (en este paso encenderemos la estufa y la parafina a 60°C)
- Dos pases de 1 hora cada uno en alcohol de 100°
- 1 hora en butanol (también se puede usar tolueno)
- Tres pases de parafina de 1 hora cada uno
- Identificar los moldes y montar
- Dejaremos a temperatura ambiente 24 h, para desmoldar los bloques dejar en hielo unos minutos.

### Cortes

Se realizaron cortes con micrótopo de rotación MICROM HM 325 (Foto2).

Para los cortes de retina no se procedió a hacer el vaciado del globo ocular, se practicaron cortes de 7 $\mu$  de grosor y se comenzó por la porción posterior a nivel del nervio óptico que se utilizaba como referencia, el estudio sobre la retina se realizó en aquellas cortes donde la retina cubría más del 75 % del perímetro de corte y esta es homogénea en aumentos al microscopio óptico de 10X. Se realizaron un total de 4-5 cortes por porta, en 5 portas por muestra.

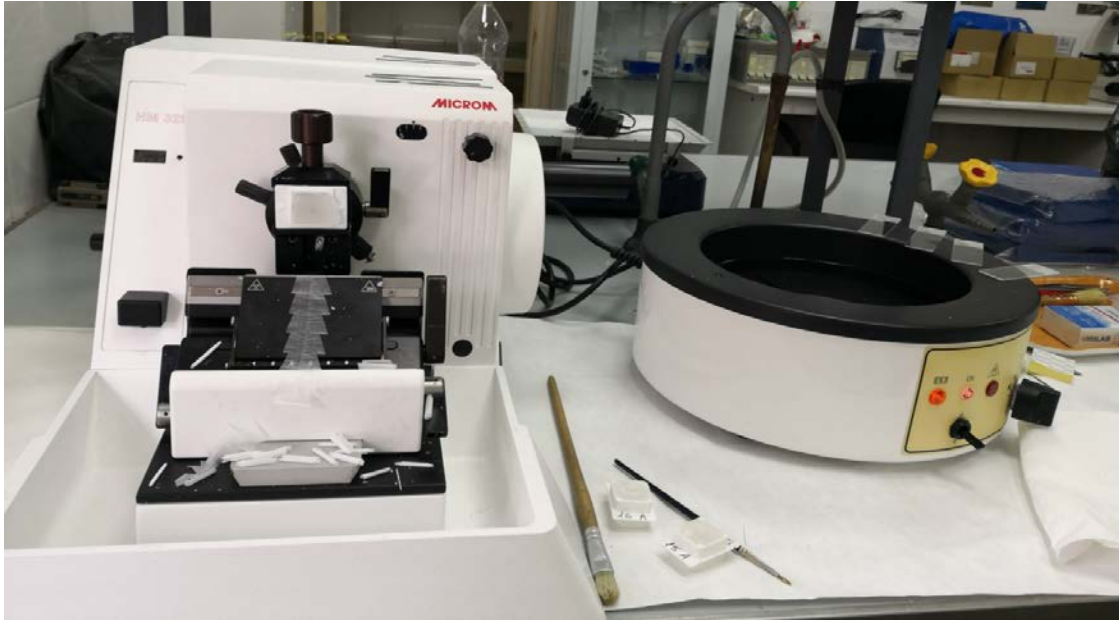


Foto 2. Microtomo de rotación

En riñón, se practicaron cortes de 3 y 5  $\mu\text{m}$ , 1-2 cortes de riñón por porta, 2 portas por muestra.

Los cortes realizados se dejarán en estufa a 37°C durante 24 horas aproximadamente.

### Tinciones

Las tinciones que se realizaron fueron en función del tipo de tejido y de lo que se quería medir

Se realizaron dos tipos de tinciones:

- Hematoxilina- Eosina (retina y riñón)
- PAS (riñón)

Se siguieron protocolos convencionales de tinción:

### *Tinción hematoxilina-eosina*

- 1- Desparafinado
  - Cogimos los cortes de la estufa metidos el día anterior.
  - Sumergimos en xilol en dos pases de 15 y 10 minutos cada uno.

## 2- Hidratación

- 10 minutos en alcohol absoluto.
- 10 minutos en alcohol 96.
- 10 minutos en alcohol 70.
- 10 minutos en alcohol 50.

## 3- Lavado

- Lavar en agua destilada durante 2 minutos.

## 4- Tinción

- 6 minutos sumergidos en hematoxilina.
- Lavar con agua corriente 3-4 minutos.
- 2 minutos sumergidos en eosina.
- Lavar con aguas corriente.
- Lavar con agua destilada.

## 5- Deshidratación

- 3 minutos en alcohol de 70.
- 3 minutos en alcohol de 96.
- 3 minutos en alcohol de 100.
- 15 minutos en xilol.

## 6- Montaje en DpX.

Por último, se montan los portas en la campana de extracción.

### *Tinción PAS*

Tras desparafinar e hidratar:

- Dejar 5 minutos en ácido periódico al 5%.
- Lavado en agua destilada.
- 15-30 minutos en reactivo de Schiff.
- Aclaramiento: tres sucesivos de 2 minutos cada uno en baño sulfuroso.
- Durante 5 minutos lavar en agua corriente.
- 30-60 segundos en hematoxilina de Harris.
- 5 minutos lavar en agua corriente.
- Deshidratar, aclarar y montar.

### *Análisis de imagen*

Las medidas morfométricas de las secciones teñidas se realizaron en un sistema de análisis de imágenes: las imágenes histológicas se tomaron con un Microscopio Virtual Slide (Olympus BX-UCB, con el software VS-ASW FL, Hamburgo, Alemania), luego se obtuvieron imágenes glomerulares con el QuPach-0.2 (Foto 3).

El parámetro morfométrico se obtuvo con el programa ImageJ FIJI (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

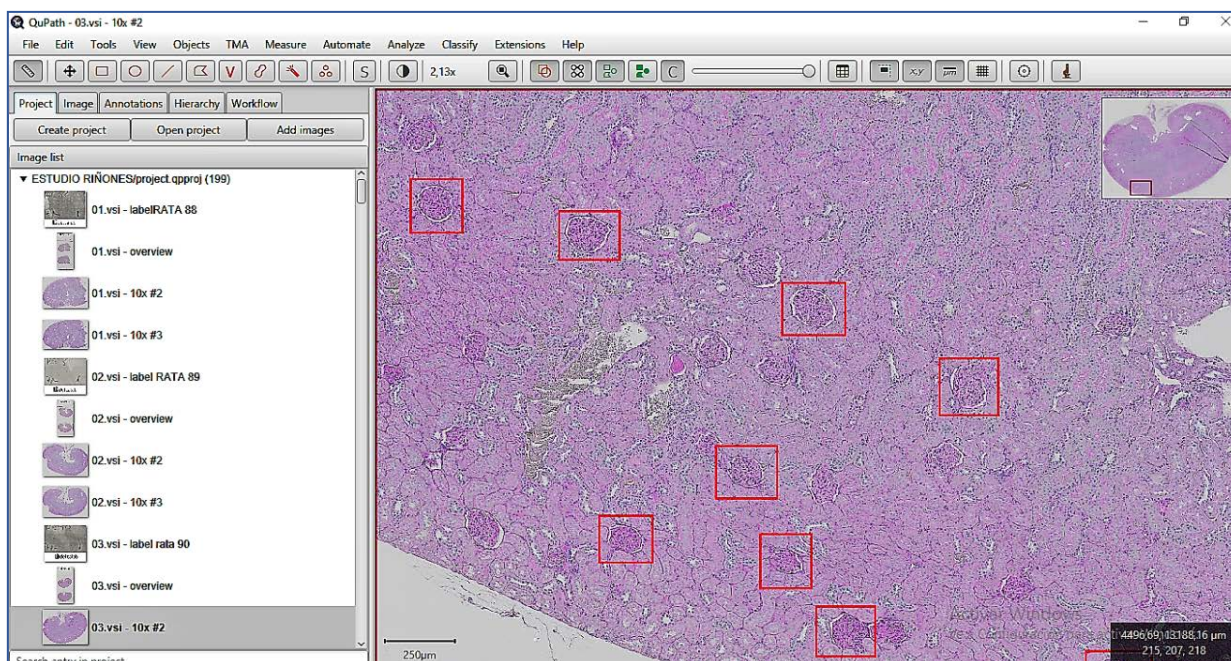


Foto 3.QuPach-0.2

### ***Análisis morfométrico del riñón***

El riñón derecho de cada rata se fijó en formalina tamponada neutra al 10% y se procesó para obtener secciones de parafina de 5 µm para métodos de tinción de reacción estándar de hematoxilina y eosina (H&E) y ácido periódico-Schiff (PAS).

Para el volumen glomerular (GV) determinado, el área glomerular (GA) de 50 glomérulos se midió de la siguiente manera (Lane et al., 1992):

$$GV = (GA)^{3/2} \times \beta/d$$

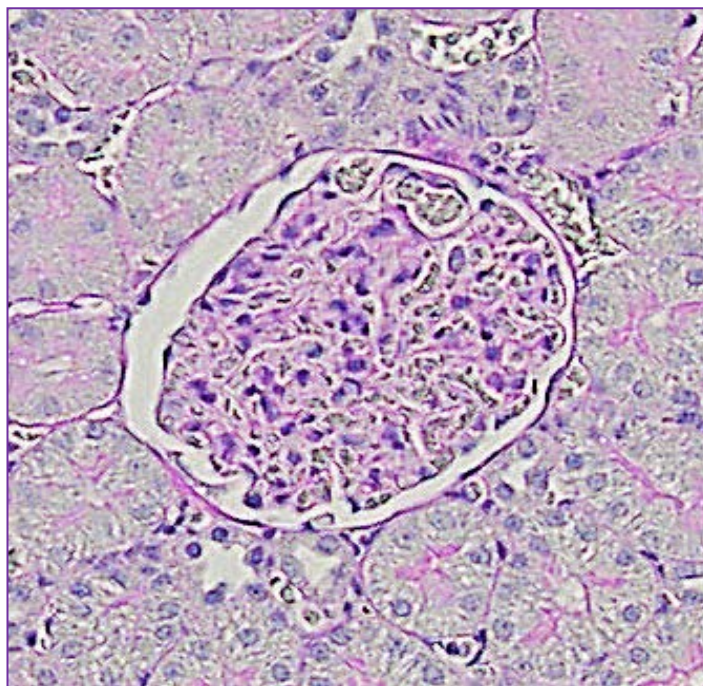
donde  $\beta$  es un coeficiente de forma adimensional ( $\beta = 1.0$  para esferas perfectas), y  $d$  es un coeficiente de distribución de tamaño utilizado para ajustar las variaciones en el tamaño glomerular.

La tasa de glomerulosclerosis se calculó a partir de cortes teñidos con PAS en 50 glomérulos por corte. Se cuantificó el área de cada glomérulo y se calculó el área positiva de PAS en estos glomérulos utilizando el programa de análisis de imágenes, de la siguiente manera

$$GMS = [PAS (+)A \text{ (}\mu\text{m}^2) / GA \text{ (}\mu\text{m}^2)] \times 100$$



donde GMS es el porcentaje de área glomerular con material PAS (+), PAS (+) A es el área ocupada con material PAS (+) en un glomérulo y GA es el área de este glomérulo.



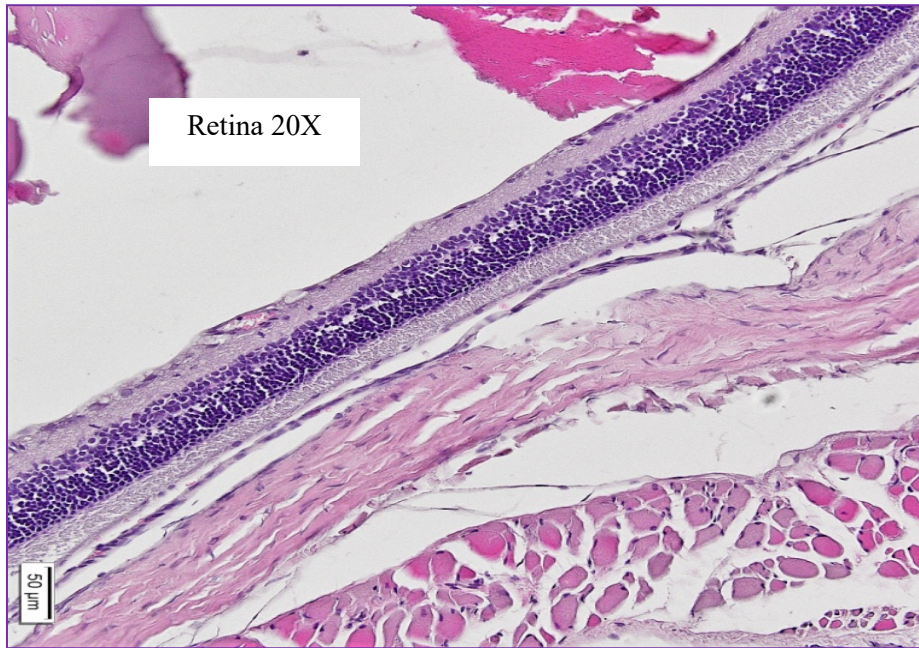
Glomérulo Tinción PAS+

### ***Análisis morfométrico de retina***

Una vez obtenidos los globos oculares y tras limpieza con solución salina, se fijaron con formaldehído al 10% durante 48 horas en suave agitación y a temperatura ambiente, seguido de la fijación e inclusión en parafina siguiendo un protocolo convencional para posteriormente realizar cortes con un microtomo rotatorio HM 325 (Leica Biosystems, Nussloch GmbH, Alemania), como se ha indicado anteriormente.

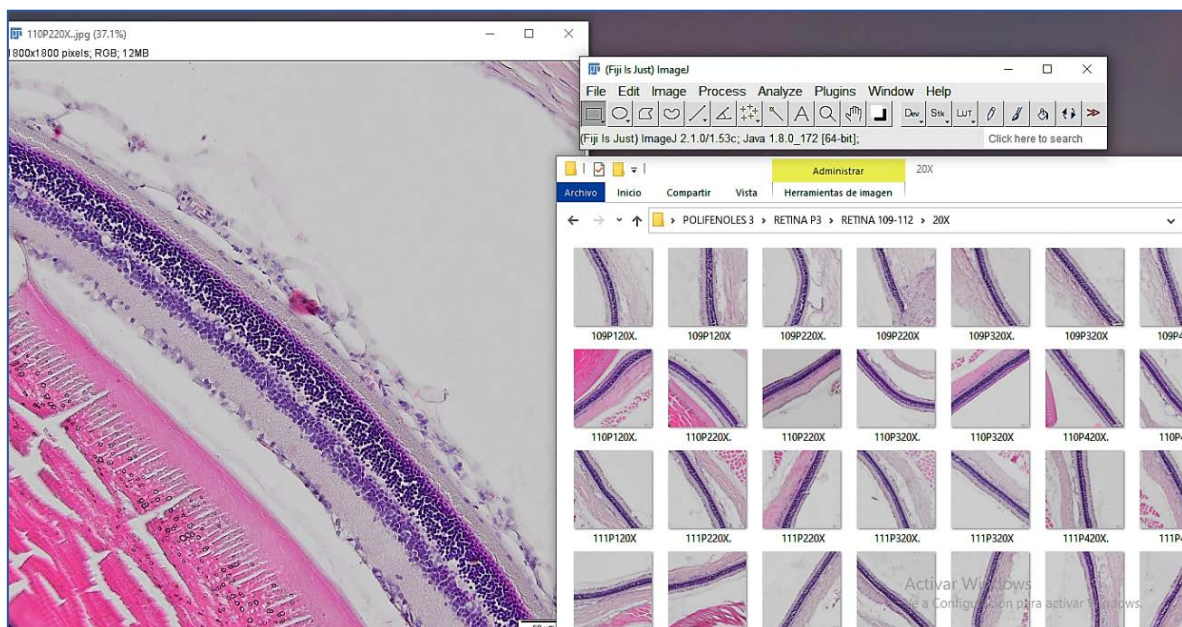
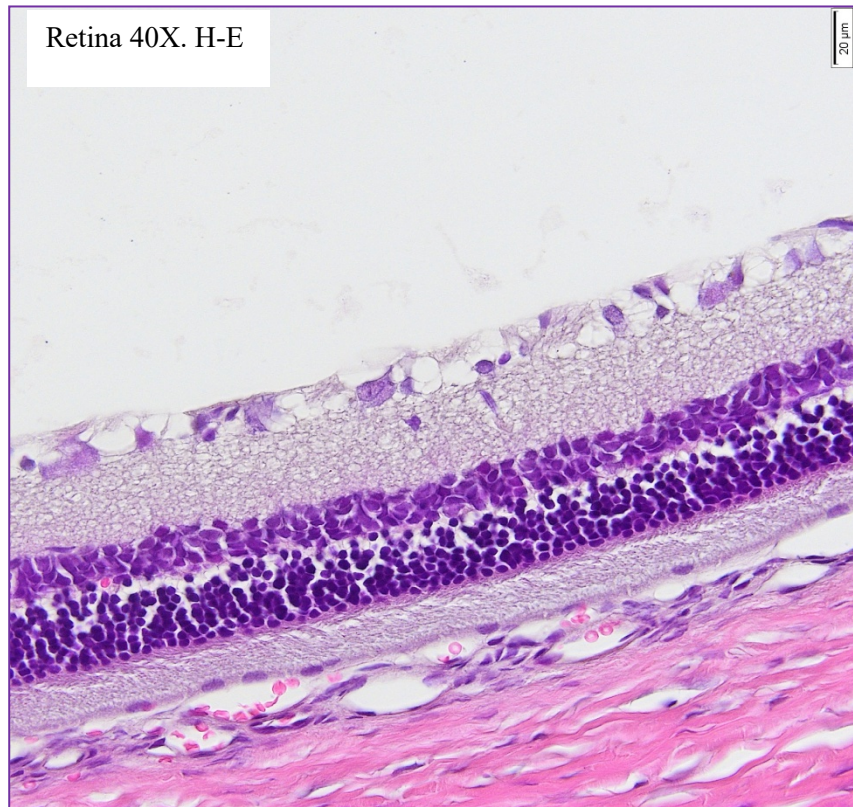
Se realizó un estudio cuantitativo en el que se midió: grosor de la retina y números de células ganglionares de la capa ganglionar. Se midieron dos cortes por porta, en un total de 5 portas por muestra.

Para el grosor se utilizaron fotos de tamaño 20X, y se midió en aquellas zonas de la retina que presentaba un aspecto homogéneo. El grosor medido se realizó desde la capa limitante externa a la capa de células ganglionares.



Para el recuento de células ganglionares se utilizaron fotos de 40X, donde se midió la longitud y se realizó el recuento en esa longitud, el resultado final se expresaba en números de células ganglionares por cada 100  $\mu$  de longitud de la capa ganglionar.





Programa de procesamiento de imagen FIJI, con el que se midieron todos los parámetros explicados anteriormente.

Los cortes de la retina se realizaron con un grosor de 7  $\mu\text{m}$  y siempre se iniciaron en la zona posterior a nivel del nervio óptico, el estudio morfométrico se realizó en imágenes 20X y 40X.

Después del desparafinado se procedió a la tinción con hematoxilina-eosina. Se realizó un estudio cuantitativo de forma simple ciego sobre los cortes histológicos obtenidos por dos observadores independientes, en el que se evaluaron los siguientes parámetros (Szabadfi et al, 2012): 1. Espesor entre la membrana limitante interna y externa, que es equivalente al grosor de la retina; 2. ONL es el espesor de la capa nuclear o granular exterior; 3. OPL es el espesor de la capa plexiforme externa; 4. INL es el espesor de la capa nuclear o granular interna; y 5. IPL es el espesor de la capa plexiforme interna. Las células de la capa ganglionar se contaron en un total de 10 cortes por rata a una distancia conocida, que será la de la foto de 40x después de la tinción, en un promedio de 300 $\mu$ , aunque los resultados se dieron con respecto a 100  $\mu\text{m}$  para ser la misma área para todas las muestras.

### **3.4. Análisis estadístico**

Los datos del texto, las tablas y las figuras se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de 10 animales. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el Statistical Package for Social Sciences v. 25.0 (SPSS Co., Chicago, IL, EE. UU.). Se utilizaron análisis de varianza unidireccionales seguido de transformación de Bonferroni y pruebas t de Student no apareado. Para establecer una posible relación entre los datos morfológicos de la retina y otras variables bioquímicas se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson. En todos los casos, se asumió significación estadística con un valor de  $p < 0,05$ .





# RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Resultados zoométricos

Los animales diabéticos mostraron una evolución del peso corporal menor que los no diabéticos, la administración de hidroxitirosol no modificó esta variable de forma significativa (Fig 4.1). Por otra parte, todos los animales diabéticos, controles y tratados con hidroxitirosol, presentaron cifras de glucosa en sangre muy superiores a los animales no diabéticos, tan solo el grupo tratado con la dosis de 5 mg/kg/día p.o. redujo las cifras de glucosa en sangre el primer mes de tratamiento, pero no se apreciaron diferencias significativas al final del periodo de estudio (Fig 4.1). Por último, los animales diabéticos, controles y tratados con hidroxitirosol, ingirieron una mayor cantidad de pienso y agua diariamente (Fig 4.1). Los riñones de los animales controles diabéticos mostraron un mayor peso relativo ( $100 \times \text{peso del riñón} / \text{peso corporal}$ ) que los controles sanos ( $0.6 \pm 0.04$  vs  $0.8 \pm 0.04$ ,  $p < 0.05$ ), hidroxitirosol no modificó este parámetro ni con 1 mg/kg/día p.o. ( $0.7 \pm 0.03$ ) ni con 5 mg/kg/día p.o. ( $0.7 \pm 0.02$ ).

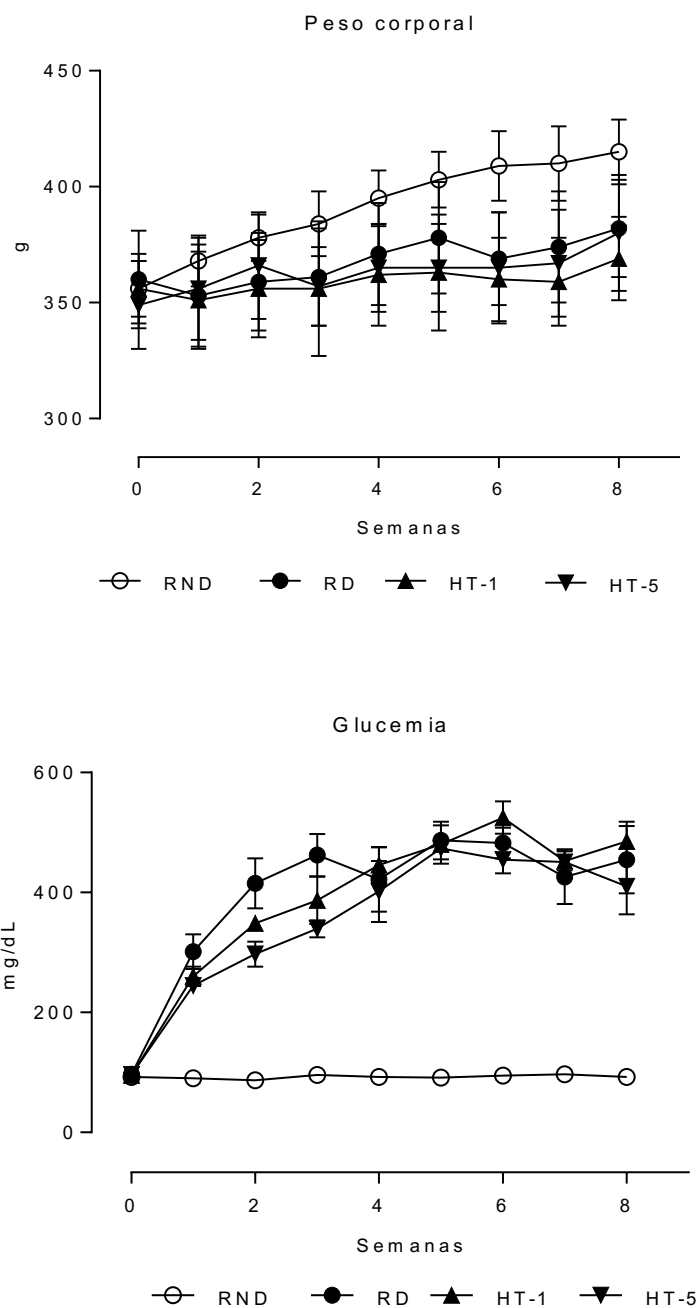


Figura 4.1. Evolución temporal del peso corporal, glucemia, comida y bebida ingeridas en ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo.

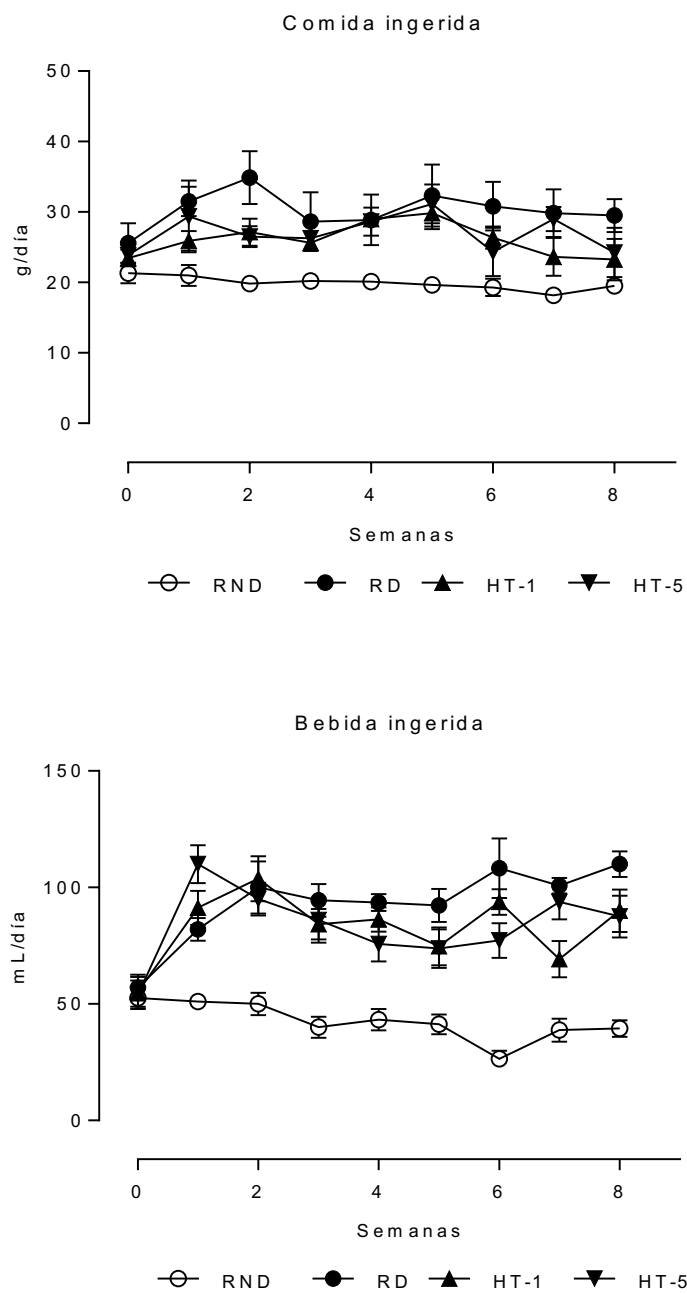


Figura 4.1. (continuación)



## 4.2. Resultados de bioquímica y hematimetría

El perfil bioquímico sérico (Tabla 4.1) muestra un incremento significativo en los niveles de glucosa en todos los grupos de animales diabéticos, no observando modificaciones tras dos meses de tratamiento con hidroxitirosol. Los niveles de creatinina se duplicaron en los animales diabéticos, reduciéndose tras la administración de hidroxitirosol (42.8% de reducción con 1 mg/kg/día p.o. y 28.5% con 5 mg/kg/día p.o.). El resto de variables no se modificaron significativamente.

No se apreciaron cambios significativos en el perfil hematimétrico (Tabla 4.2), hepático ni lipídico en los distintos grupos de animales estudiados (Tabla 4.3).

En las muestras de orina (Tabla 4.4) se observa un importante nivel de glucosuria, el cual no se modifica tras el tratamiento con hidroxitirosol. Los niveles urinarios de creatinina se redujeron significativamente en los animales controles diabéticos, incrementándose tras el tratamiento con hidroxitirosol. La proteinuria (Tabla 4.4 y Fig 4.2) fue significativamente mayor en los animales diabéticos (factor de incremento = 5.9), reduciéndose tras la administración de 1 mg/kg/día p.o. (67.8%) y 5 mg/kg/día p.o. (72.9%) de hidroxitirosol. El aclaramiento de creatinina calculado (Fig 4.2) fue significativamente menor en los animales controles diabéticos (reducción de un 49.6% respecto a los animales sanos), incrementándose tras el tratamiento con 1 mg/kg/día p.o. (incremento de un 38.0% respecto a los controles diabéticos) y 5 mg/kg/día p.o. (incremento de un 26.7% respecto a los controles diabéticos) de hidroxitirosol.

Tabla 4.1. Variables bioquímicas de las muestras de suero (media  $\pm$  SEM) en las ratas no diabéticas (RND, ratas diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT) 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo.

Variable	RND	RD	p vs RND	RD+HT-1	p vs RD	RD+HT-5	p vs RD
Glucosa (mg/dL)	90,0 $\pm$ 5.5	471 $\pm$ 9.9	0.0001	442 $\pm$ 30.5	n.s.	451 $\pm$ 42.7	n.s.
Urea (mg/dL)	36.0 $\pm$ 1.7	35.5 $\pm$ 2.1	n.s.	45.0 $\pm$ 3.3	0.05	57.3 $\pm$ 1.7	0.0001
Creatinina (mg/dL)	0,3 $\pm$ 0.01	0.7 $\pm$ 0.03	0.0001	0.4 $\pm$ 0.04	0.001	0.5 $\pm$ 0.04	0.0001
Na <sup>+</sup> (mEq/L)	149 $\pm$ 1.7	147 $\pm$ 1.7	n.s.	146 $\pm$ 1.5	0.02	148 $\pm$ 2.1	0.04
K <sup>+</sup> (mEq/L)	5.6 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.6	0.04	4.2 $\pm$ 0.2	n.s.	4.1 $\pm$ 0.4	n.s.
Proteínas (g/dL)	5.7 $\pm$ 0.07	5.5 $\pm$ 0.1	n.s.	5.2 $\pm$ 0.05	n.s.	5.6 $\pm$ 0.2	n.s.
Albumina (g/dL)	1.5 $\pm$ 0.08	1.4 $\pm$ 0.1	n.s.	1.4 $\pm$ 0.08	n.s.	1.5 $\pm$ 0.1	n.s.

n.s. = diferencias no significativas.

Tabla 4.2. Variables hematimétricas en sangre total (media  $\pm$  SEM) en las ratas no diabéticas (RND, ratas diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT) 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo.

	RND	RD	RD+HT-1	RD+HT-5
Hematíes ( $\times 10^{12}/L$ )	8.6 $\pm$ 0.2	9.0 $\pm$ 0.2	8.2 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.2
Leucocitos ( $\times 10^6/L$ )	6.1 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 1.9	5.3 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.3
Plaquetas ( $\times 10^6/L$ )	909 $\pm$ 33	924 $\pm$ 20	882 $\pm$ 30	890 $\pm$ 22
Hemoglobina (g/L)	16.0 $\pm$ 0.4	16.7 $\pm$ 0.5	16.3 $\pm$ 0.3	16.7 $\pm$ 0.3
Hematocrito (%)	46.8 $\pm$ 1.0	46.4 $\pm$ 1.3	45.8 $\pm$ 0.8	48.4 $\pm$ 0.7

\*P < 0.0001 respecto al resto de grupos.

Tabla 4.3. Variables de perfil hepático y lipídico (media  $\pm$  SEM) en las ratas no diabéticas (RND, ratas diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT) 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo.

	RND	RD	RD+HT-1	RD+HT-5
AST (U/L)	86.5 $\pm$ 2.21	116.3 $\pm$ 5.4*	58.7 $\pm$ 5.4	58.6 $\pm$ 3.0
ALT (U/L)	53.1 $\pm$ 6.1	87.8 $\pm$ 3.1*	48.3 $\pm$ 3.4	59.3 $\pm$ 2.0
GGT (U/L)	1.0 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.5
FA (U/L)	77.1 $\pm$ 6.2*	269.8 $\pm$ 19.5	246.8 $\pm$ 14.7	229.3 $\pm$ 21.8
Col T (mg/dL)	57.7 $\pm$ 1.0	78.7 $\pm$ 1.8*	67.3 $\pm$ 2.8	68.3 $\pm$ 1.5
LDLc (mg/dL)	23.0 $\pm$ 2.9	33.5 $\pm$ 4.2	22.3 $\pm$ 3.1	30.1 $\pm$ 5.1
HDLc (mg/dL)	18.5 $\pm$ 1.2	18.5 $\pm$ 2.9	25.0 $\pm$ 0.7	30.1 $\pm$ 4.7
TG (mg/dL)	67.5 $\pm$ 8.8	102.8 $\pm$ 8.6	99.2 $\pm$ 17.2	102.6 $\pm$ 20.9

AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanino aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; FA: fosfatasa alcalina; Col T: colesterol total; LDLc: LDL colesterol; HDLc: HDL colesterol; TG: triglicéridos

\*P < 0.0001 respecto al resto de grupos.

Tabla 4.4. Variables bioquímicas urinarias seguimiento en ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo

Variable	RND	RD	p vs RND	HT-1	p vs RD	HT-5	p vs RD
Creatinina (mg/dL)	103 ± 3.7	60.6 ± 3.2	0.0001	72.5 ± 3.1	0.01	74.7 ± 3.8	0.001
Proteinuria (mg/L)	13.1 ± 0.8	91.9 ± 4.7	0.0001	57.8 ± 5.8	0.004	37.7 ± 3.4	0.0001
Proteinuria (mg/24 h)	31.1 ± 8.1	185 ± 17.5	0.005	59.4 ± 7.0	0.004	50.0 ± 2.65	0.008
Urea (mg/L)	2077 ± 700	2013 ± 225	n.s.	2309 ± 131	n.s.	2389 ± 342	n.s.
Glucosuria (mg/L)	0.0 ± 0.0	4065 ± 1611	0.0001	1958 ± 643	n.s.	4752 ± 1803	n.s.
Na <sup>+</sup> (mEq/L)	28.0 ± 3.6	42.5 ± 7.6	0.002	57.5 ± 13.5	n.s.	13.7 ± 5.5	n.s.
K <sup>+</sup> (mEq/L)	52.3 ± 20.3	68.7 ± 17.5	n.s.	66.1 ± 6.1	0.01	66.0 ± 1 6.1	n.s.
pH	7.8 ± 0.6	7.3 ± 0.8	n.s.	6.9 ± 1.1	n.s.	7.5 ± 0.9	n.s.

n.s. = diferencias no significativas

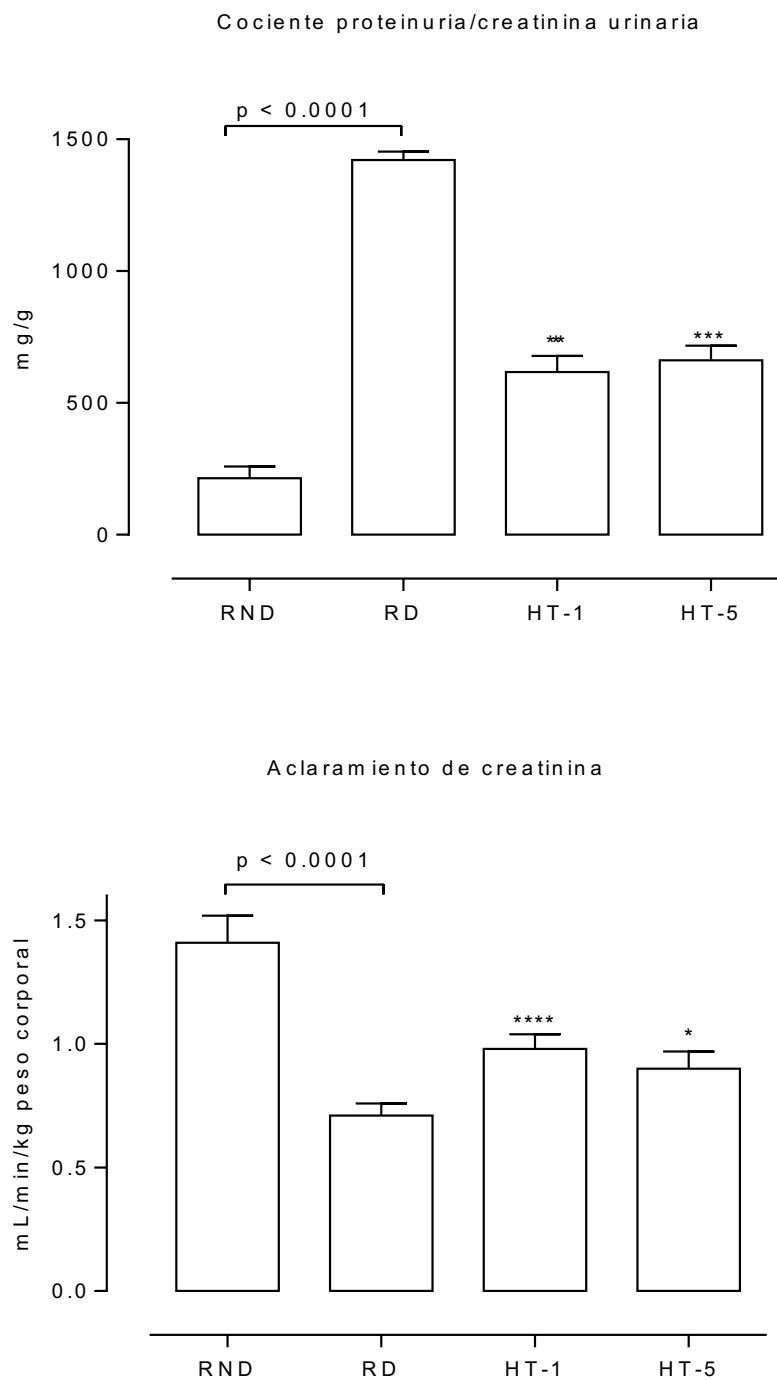


Figura 4.2. Valores medios del cociente proteinuria/creatinina urinaria y aclaramiento de creatinina tras ocho semanas de seguimiento en ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo. \* $p = 0.04$ , \*\* $p = 0.001$ , \*\*\* $p = 0.004$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , respecto a RD.

### 4.3. Resultados de las variables plaquetarias y endoteliales

Los valores de las variables plaquetarias fueron significativamente más altos en ratas controles diabéticas que en animales normoglucémicos: 91% más altos para la agregación plaquetaria y 72,5% más altos para la producción de TxB<sub>2</sub>. La administración de hidroxitirosol redujo la intensidad máxima de agregación plaquetaria (I<sub>max</sub>) en un 21,6% (1 mg/kg/día) y un 42% (5 mg/kg/día, P <0,05 en comparación con la dosis más baja), y redujo la producción de TxB<sub>2</sub> en un 20,7% (1 mg/kg/día) y 26,7% (5 mg/kg/día) en comparación con los animales diabéticos no tratados con hidroxitirosol (Tabla 4.5).

La producción de prostaciclina vascular, determinada como su metabolito activo 6-keto-PGF<sub>1</sub>α, fue 50% menor en los animales diabéticos no tratados que en el grupo normoglucémico. El tratamiento con hidroxitirosol redujo esta disminución al 40% (1 mg/kg/día) y al 10% (5 mg/kg/día, P <0,001 en comparación con la dosis más baja); estos valores fueron similares a los de los animales no diabéticos (P <0,1).

Asimismo, la excreción de prostanoïdes por vía urinaria se encuentra alterada en los animales controles diabéticos (Tabla 4.5), mostrando un incremento de la cantidad de 11-11-dehydro-tromboxano B<sub>2</sub> (11-dH-TxB<sub>2</sub>) y un descenso de la cantidad de 6-keto-prostaglandin F<sub>1</sub>α. La administración de hidroxitirosol reduce la producción de 11-dH-TxB<sub>2</sub>, solo la dosis de 5 mg/kg/día p.o. disminuye el descenso de 6-keto-PGF<sub>1</sub>α de los animales controles diabéticos.

Tabla 4.5. Valores medios (media  $\pm$  SEM) de la intensidad máxima de agregación plaquetaria inducida con colágeno (Imax), niveles séricos de tromboxano B<sub>2</sub> (metabolito estable del tromboxano A<sub>2</sub>), aórticos de 6-keto prostaglandina F<sub>1 $\alpha$</sub>  (metabolito estable de la prostaciclina, y urinarios de 11-dehydro-tromboxano B<sub>2</sub> y 6-keto prostaglandina F<sub>1 $\alpha$</sub> , en ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo

	RND	RD	HT-	HT-5
Imax (ohms)	12.8 $\pm$ 1.0	24.5 $\pm$ 1.9**	19.2 $\pm$ 1.4 <sup>†††</sup>	14.2 $\pm$ 1.6 <sup>†††</sup>
Suero				
Thromboxano B <sub>2</sub> (pg/mL)	47.3 $\pm$ 3.8	81.6 $\pm$ 5.9**	64.7 $\pm$ 5.1 <sup>†††</sup>	59.8 $\pm$ 6.0 <sup>†††</sup>
Anillos aórticos				
6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> (pg/mg aorta)	1.0 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.04*	0.6 $\pm$ 0.04	0.9 $\pm$ 0.06 <sup>†</sup>
Orina				
11-dH-TxB2 (ng/mg creatinina)	4.1 $\pm$ 0.8	9.8 $\pm$ 0.6**	6.4 $\pm$ 1.0	4.3 $\pm$ 0.8 <sup>††</sup>
6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> (pg/mg creatinina)	13.8 $\pm$ 2.1	7.0 $\pm$ 0.5*	8.4 $\pm$ 0.7	11.8 $\pm$ 1.3 <sup>††</sup>

\*p < 0.01, \*\*p < 0.0001 respecto a RND. <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>††</sup>p < 0.001, <sup>†††</sup>p < 0.0001, respect a RD.



#### 4.4. Resultados de las variables de estrés oxidativo y nitrosativo

Todas las variables de estrés oxidativo tanto en suero (Tabla 4.6) como el tejido renal (Tabla 4.7) están alteradas en los animales controles diabéticos. Los marcadores de daño oxidativo están incrementados significativamente y los de defensa antioxidante disminuidos. Así mismo la concentración de 3-nitrotirosina (estrés nitrosativo) también están aumentadas. La administración de hidroxitirosol reduce este desequilibrio (de forma estadísticamente significativa), excepto la concentración sérica de oxLDL con 1 mg/kg/día y el descenso de defensa antioxidante cuantificado en los controles diabéticos en tejido renal, con ninguna de las dos dosis utilizadas. Por último, la concentración de 3-nitrotirosina, incrementada en los controles diabéticos, se reduce significativamente, tanto en suero como en tejido renal, con ambas dosis de hidroxitirosol.

La producción de prostaglandinas producidas por la presencia de radicales libres (8-isoprostanos) también se encuentra alterada en los animales controles diabéticos (Tabla 4.7), mostrando un incremento de la cantidad de 8-isoprostanos urinarios. La administración de hidroxitirosol reduce la producción de 8-isoprostanos.

Tabla 4.6. Variables de estrés oxidativo y nitrosativo en muestras de suero en ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo.

Variable	RND	RD	p vs RND	HT-1	p vs RD	HT-5	p vs RD
TBARS (nmol/mL)	4.2 ± 0.4	8.44 ± 0.4	0.0001	6.9 ± 0.8	0.023	4.3 ± 0.3	0.0001
oxLDL (ng/mL)	14.6 ± 1.6	24.4 ± 0.7	0.0001	21.5 ± 1.7	n.s.	13.3 ± 0.5	0.0001
8-OHdG (ng/mL)	16.1 ± 0.2	26.3 ± 0.8	0.0001	19.6 ± 1.7	0.010	15.4 ± 0.7	0.0001
GHS (nmol/mL)	127 ± 3.9	91.3 ± 3.9	0.0001	109 ± 5.7	0.030	117 ± 7.8	0.02
GSHpx (nmol/min/mL)	7.8 ± 0.6	19.0 ± 1.8	0.0001	11.3 ± 1.3	0.005	11.6 ± 1.7	0.02
CAT (U/mL)	17.9 ± 0.3	13.2 ± 0.4	0.0001	16.6 ± 0.3	0.001	16.6 ± 0.7	0.01
3-nitrotirosina (pg/mL)	1.5 ± 0.05	6.4 ± 0.3	0.0001	3.2 ± 0.1	0.0001	3.5 ± 0.2	0.0001

n.s. = diferencias no significativas

8-OHdG: 8-hidroxi-2-deoxiguanosina. GSH: glutatión reducido. GSHpx: actividad glutatión peroxidasa. oxLDL: colesterol-LDL oxidado. CAT: capacidad antioxidante total. TBARS: productos de reacción con ácido tiobarbitúrico.

Tabla 4.7. Variables de estrés oxidativo y nitrosativo en muestras de riñón en ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo.

Variable	RND	RD	p vs RND	HT-1	p vs RD	HT-5	p vs RD
TBARS (nmol/mg proteína)	35.7 ± 3.4	135 ± 14.2	0.001	61.0 ± 4.4	0.002	44.9 ± 1.8	0.002
8-OHdG (ng/0.1 g tejido)	7.1 ± 0.3	12.6 ± 0.3	0.0001	9.0 ± 0.3	0.0001	8.2 ± 0.3	0.0001
GSH (μmol/0.1 g tejido)	475 ± 12.8	150 ± 10.1	0.0001	289 ± 25.1	0.002	365 ± 20.5	0.0001
GSHpx (nmol/min/0.1 g tejido)	91.4 ± 3.4	65.0 ± 3.1	0.0001	56.4 ± 4.3	n.s.	63.9 ± 3.2	n.s.
CAT (U/0.1 g tejido)	87.2 ± 3.0	40.2 ± 7.6	0.001	58.5 ± 7.0	n.s.	70.1 ± 15.1	n.s.
3-nitrotirosina (pg/0.1 g tejido)	20.7 ± 0.7	117 ± 6.1	0.0001	81.6 ± 12.0	0.032	41.6 ± 7.6	0.001
8-isoprostanos urinarios (ng/mg cretinina)	6.9 ± 0.6	49.1 ± 0.6	0.0001	5.2 ± 0.5	0.0001	5.5 ± 0.5	0.0001

n.s. = diferencias no significativas

8-OHdG: 8-hidroxi-2-deoxiguanosina. GSH: glutatión reducido. GSHpx: actividad glutatión peroxidasa. CAT: capacidad antioxidante total. TBARS: productos de reacción con ácido tiobarbitúrico.

#### 4.5. Resultados de las variables de inflamación

Las variables de inflamación medidas en este estudio mostraron valores estadísticamente más altos en ratas diabéticas que en animales no diabéticos (3 veces más alto para MPOx y VCAM-1, y 1,3 veces más alto para IL-1 $\beta$ ) (Tabla 4.8). La administración de HT redujo la MPOx entre un 32% y un 66%, la VCAM-1 entre un 50% y un 81% y la IL-6 entre un 9% y un 26% en comparación con las ratas no tratadas (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Valores medios (media  $\pm$  SEM) de las siguientes variables inflamatorias: mieloperoxidasa (MPOx), VCAM-1 e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo.

	RND	RD	HT-1	HT-5
MPOx (ng/mL)	4.08 $\pm$ 0.23	12.30 $\pm$ 1.23*	4.13 $\pm$ 0.48††	7.14 $\pm$ 0.77†
VCAM-1 (ng/mL)	0.37 $\pm$ 0.03	1.16 $\pm$ 0.09*	0.43 $\pm$ 0.06††	0.58 $\pm$ 0.06††
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	1.8 $\pm$ 0.05	2.3 $\pm$ 0.06**	2.0 $\pm$ 0.05	1.7 $\pm$ 0.06††

\*P < 0.0001, \*\*P < 0.002, respect a RND. †P < 0.01, ††P < 0.0001, respecto a RD.

#### 4.6. Resultados de morfometría renal

El volumen glomerular (Fig 4.3) se incrementó significativamente en los animales controles diabéticos (69.1% respecto a los controles sanos), reduciéndose tras la administración de 1 mg/kg/día p.o. (disminución de un 22.1%) y 5 mg/kg/día p.o. (disminución de un 32.8%) de hidroxitirosol. Así mismo el índice de glomeruloesclerosis (Figs 4.3) se incrementa en los animales controles diabéticos (21.2% más que en los animales controles sanos) reduciéndose tras la administración de 1 mg/kg/día p.o. (disminución de un 13.9%) y 5 mg/kg/día p.o. (disminución de un 18.1%) de hidroxitirosol.

En la Tabla 4.9 se muestra la correlación existente, representa el análisis de las correlaciones entre las diversas variables determinadas y tres parámetros fundamentales de función renal: volumen glomerular, aclaramiento de creatinina y proteinuria (cociente proteínas/creatinina en orina).

En la Fig 4.4 se muestran ejemplos representativos de micrografías de tejido renal teñido con hematoxilina-eosina, en las que se determinó el volumen glomerular. En la Fig 4.5 se muestran ejemplos representativos de micrografías de tejido renal teñido con PAS, mostrando el área PAS+ (índice de glomeruloesclerosis).

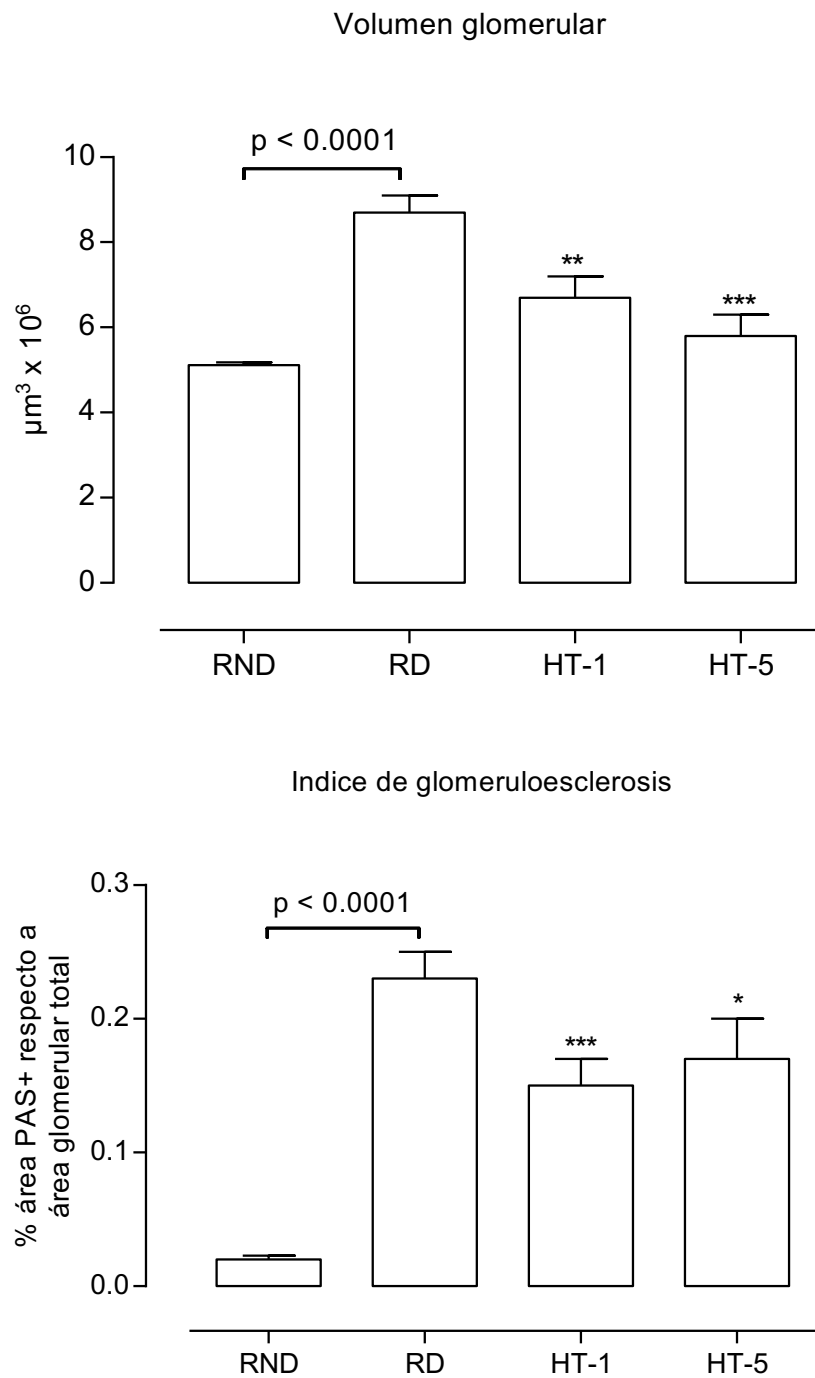
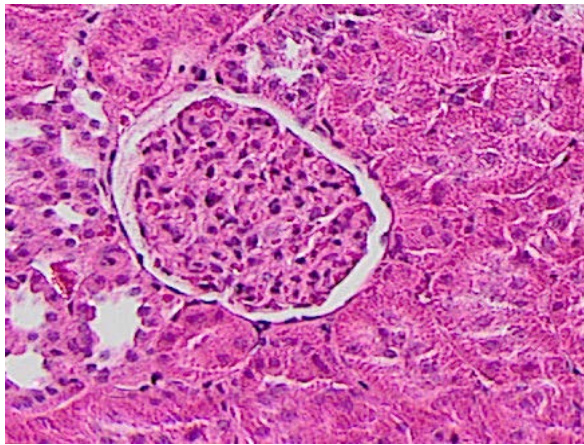
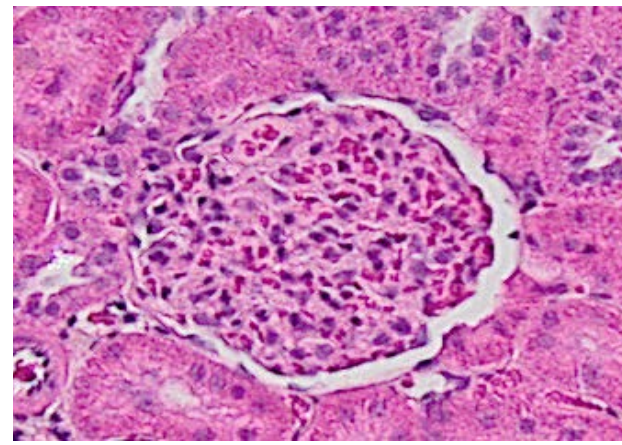


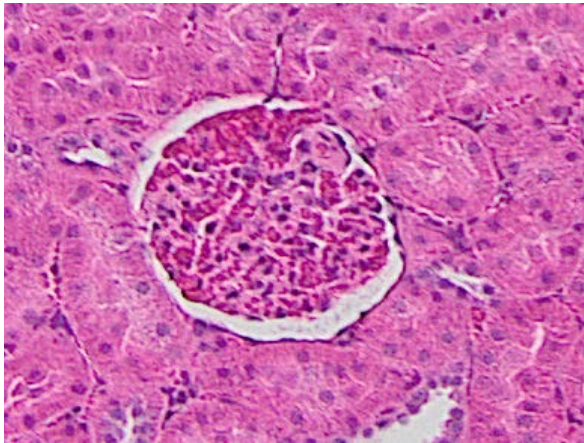
Figura 4.3. Valores medios de volumen glomerular y porcentaje de área glomerular con material PAS+ en ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo. \*p = 0.002, \*\*p = 0.001, \*\*\*p < 0.0001, respecto a RD.



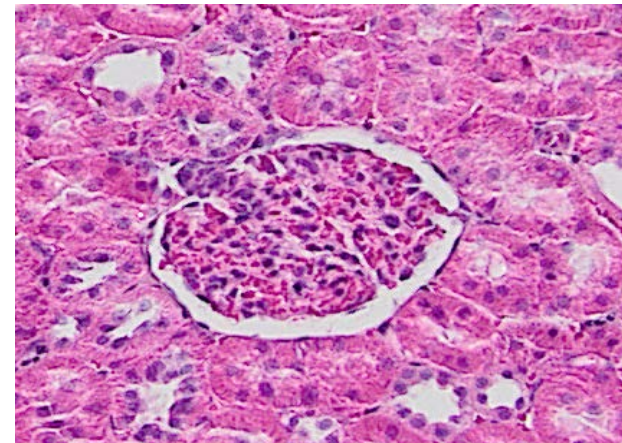
RND



RD



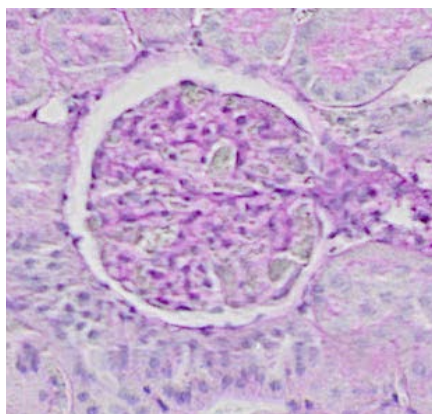
HT-1



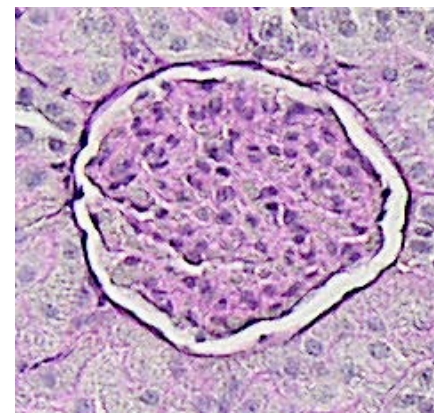
HT-5

Figura 4.4. Ejemplos representativos de imágenes de glomérulos de ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo. Hematoxilina-eosina (200X).

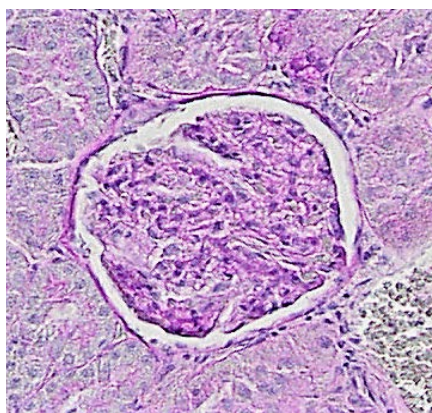




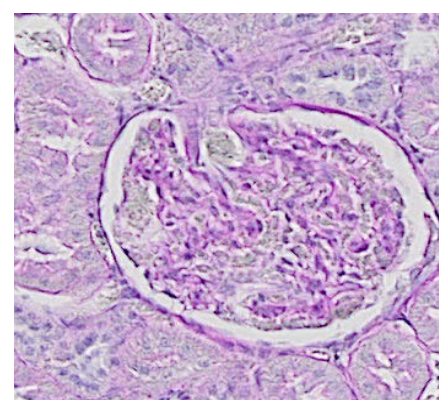
ND



RD



HT-1



HT-5

Figure 4.5. Ejemplos representativos de imágenes de glomérulos de ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo. PAS+ (200X).

Tabla 4.9. Coeficientes de correlación de Pearson entre el volumen glomerular (VG), aclaramiento de creatinina (ClCr) y el cociente proteinuria/creatinina urinaria y las variables bioquímicas de suero y orina.

Variable	VG		ClCr		Prot/Creat	
	cP	p	cP	p	cP	p
Suero						
TBARS	0.846	0.0001	-0.686	0.005	0.732	0.003
8-HdG	0.888	0.0001	-0.587	0.021	0.764	0.001
oxLDL	0.767	0.0001	-0.560	0.030	0.597	0.024
GSH	-0.829	0.0001	0.639	0.010	-0.810	0.0001
GSHpx	0.820	0.0001	-0.736	0.002	0.786	0.001
CAT	-0.833	0.0001	0.723	0.002	-0.889	0.0001
3-NTy	0.913	0.0001	-0.875	0.0001	0.960	0.0001
Tejido renal						
TBARS	0.926	0.0001	-0.681	0.005	0.918	0.0001
8-HdG	0.948	0.0001	-0.780	0.001	0.935	0.0001
GSH	-0.953	0.0001	0.816	0.0001	-0.861	0.0001
GSHpx	-0.546	0.035	0.724	0.002	-0.478	0.084
CAT	-0.783	0.001	0.707	0.003	-0.709	0.004
3-NTy	0.844	0.0001	-0.719	0.003	0.769	0.001
Orina						
8-isoprostanos	0.856	0.0001	-0.596	0.015	0.859	0.0001
11-dHTxB <sub>2</sub>	0.831	0.0001	-0.602	0.023	0.700	0.005
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	-0.636	0.015	0.595	0.025	-0.546	0.043

cP: coeficiente de Pearson. 8-OHdG: 8-hydroxy-2-deoxyguanosina. GSH: glutatión reducido. GSHpx: actividad glutatión peroxidasa. CAT: capacidad antioxidante total. TBARS: productos de reacción con ácido tiobarbitúrico. 11-dHTxB<sub>2</sub>: 11-dehydro-tromboxano B<sub>2</sub>. 6-keto-PGF<sub>1α</sub>: 6-keto prostaglandina F<sub>1α</sub>. 3-NTy: 3-nitrotirosina.

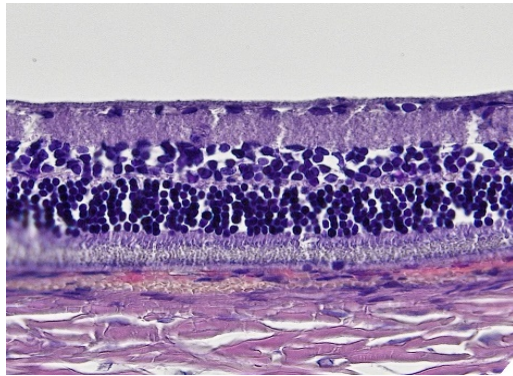
## 4.7. Resultados de morfometría retiniana

En la Fig 4.6 se muestran ejemplos representativos de retinas de los grupos experimentales. El grosor de las capas externas de la retina (ONL y OPL) se redujo significativamente en los animales diabéticos en comparación con las ratas normoglucémicas, mientras que el grosor de la capa interna (INL e IPL) aumentó en animales diabéticos (Tabla 4.10). En ambos casos, la administración de hidroxitirosol tendió a normalizar estos parámetros, pero estas variaciones alcanzaron significación estadística solo para el OPL y el INL (Tabla 4.10).

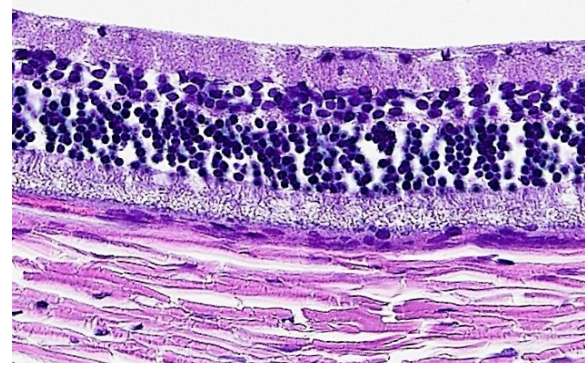
El grosor total de la retina en los animales diabéticos fue mayor que en las ratas normoglucémicas y se acercó a los valores normales en las ratas tratadas con hidroxitirosol (Fig.4.7). El aumento del grosor total de la retina en los animales diabéticos se debió a un aumento del área total ocupada por la matriz extracelular y una disminución del área ocupada por las células. En los animales diabéticos tratados con hidroxitirosol, los valores de ambas superficies fueron similares a los del grupo de control. El tamaño medio de las células retinianas fue significativamente mayor en los animales diabéticos (25,6%), y después del tratamiento con hidroxitirosol, el tamaño de las células fue similar al del grupo de control no tratado (14,1% con 1 mg/kg/día y 4,9% con 5 mg/kg/día) (Fig. 4.8).

El número de células ganglionares de la retina en animales diabéticos fue significativamente menor (44%) que en ratas normoglucémicas, y esta disminución fue menor en animales diabéticos tratados con hidroxitirosol (34% con 1 mg / kg / día y 9,1% con 5 mg / kg / día) (Fig 4.9).

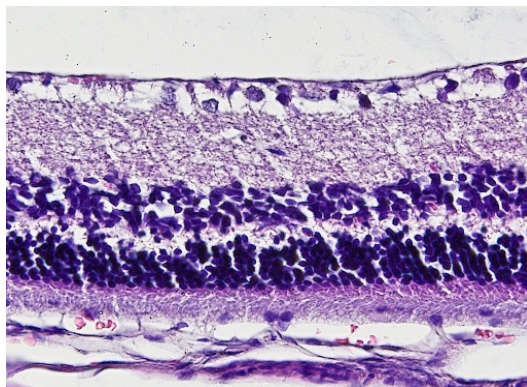
La Tabla 4.11 muestra los coeficientes de correlación y los niveles de significación bilateral para las comparaciones del número de células ganglionares de la retina y los biomarcadores vasculares.



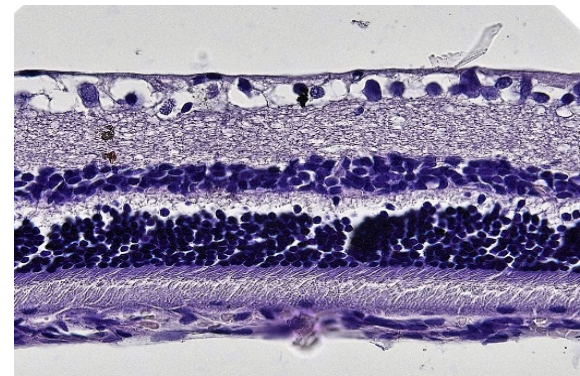
RND



RD



HT-1



HT-5

Figura 4.6. Imágenes representativas de retinas de los grupos de ratas no diabéticas (RND), ratas diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT 1 y 5 mg/kg/día p.o. durante ocho semanas. Hematoxilina y eosina (40X)



Tabla 4.10. Valores medios (media  $\pm$ SEM) del grosor de la capa nuclear externa (ONL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear interna (INL) y capa plexiforme interna (IPL) en ratas controles no diabéticas (RND), ratas controles diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol 1 mg/kg/día p.o. (HT-1) o 5 mg/kg/día p.o. (HT-5). N = 10 ratas por grupo.

	Grosor ( $\mu$ m)			
	RND	RD	HT-1	HT-5
ONL	31.9 $\pm$ 4.5	27.3 $\pm$ 2.7	23.2 $\pm$ 1.3	28.7 $\pm$ 2.8
OPL	6.8 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 0.4*	5.5 $\pm$ 0.7†	6.6 $\pm$ 0.8††
INL	16.2 $\pm$ 1.4	25.0 $\pm$ 2.9*	14.4 $\pm$ 1.2†	13.3 $\pm$ 0.4††
IPL	16.4 $\pm$ 1.3	30.2 $\pm$ 3.0**	24.1 $\pm$ 1.5	25.4 $\pm$ 1.7

\*p < 0.01, \*\*p < 0.005 respecto a RND. †p < 0.05, ††p < 0.01 respecto a RD.

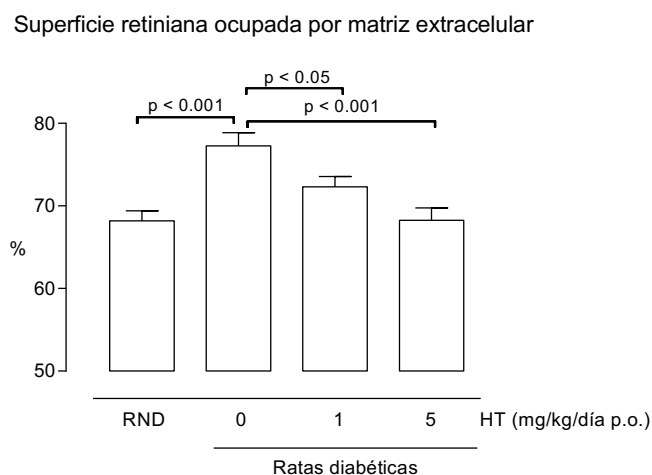
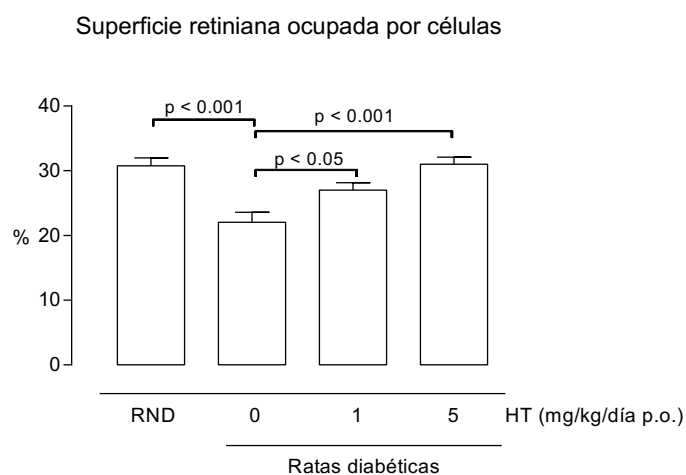
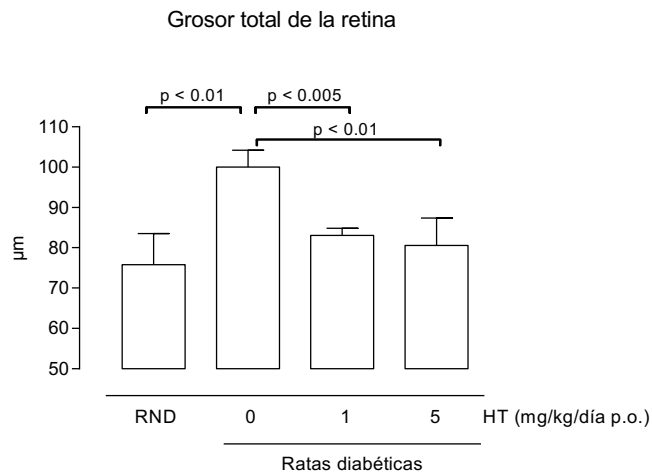


Figura 4.7. Grosor de la retina y porcentaje de la superficie retiniana ocupada por células o por matriz extracelular en ratas no diabéticas (RND), ratas diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT 1 y 5 mg/kg/día p.o.) durante ocho semanas.

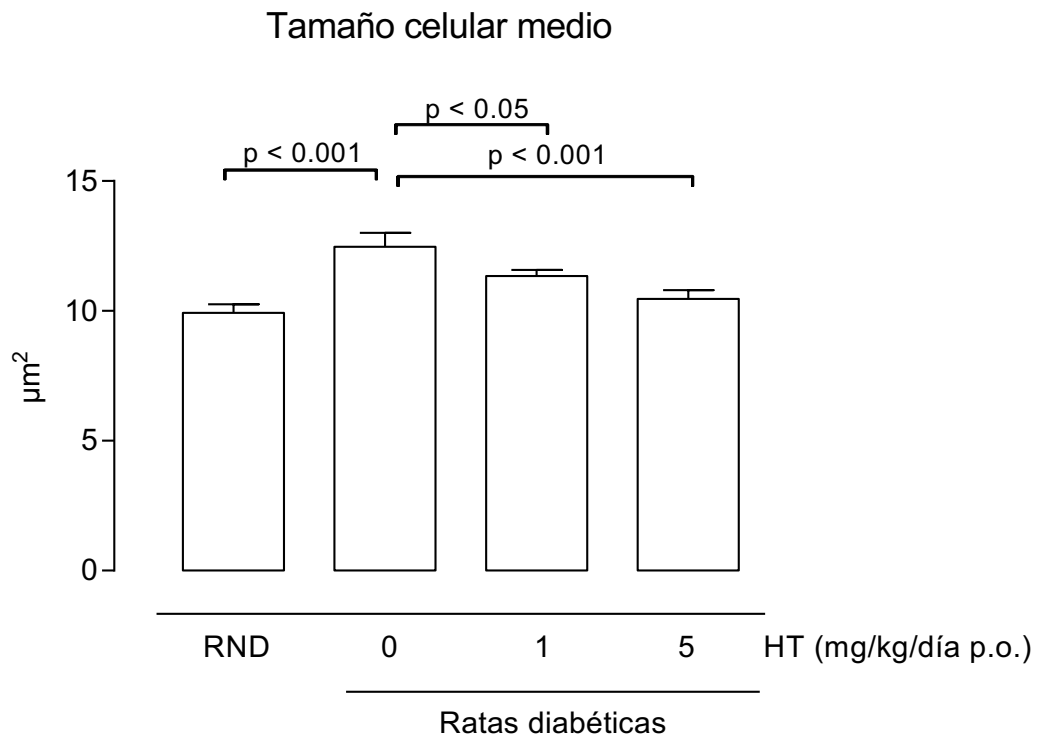


Figura 4.8. Tamaño medio de las células retinianas de ratas no diabéticas (RND), ratas diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT 1 y 5 mg/kg/día p.o. durante ocho semanas).

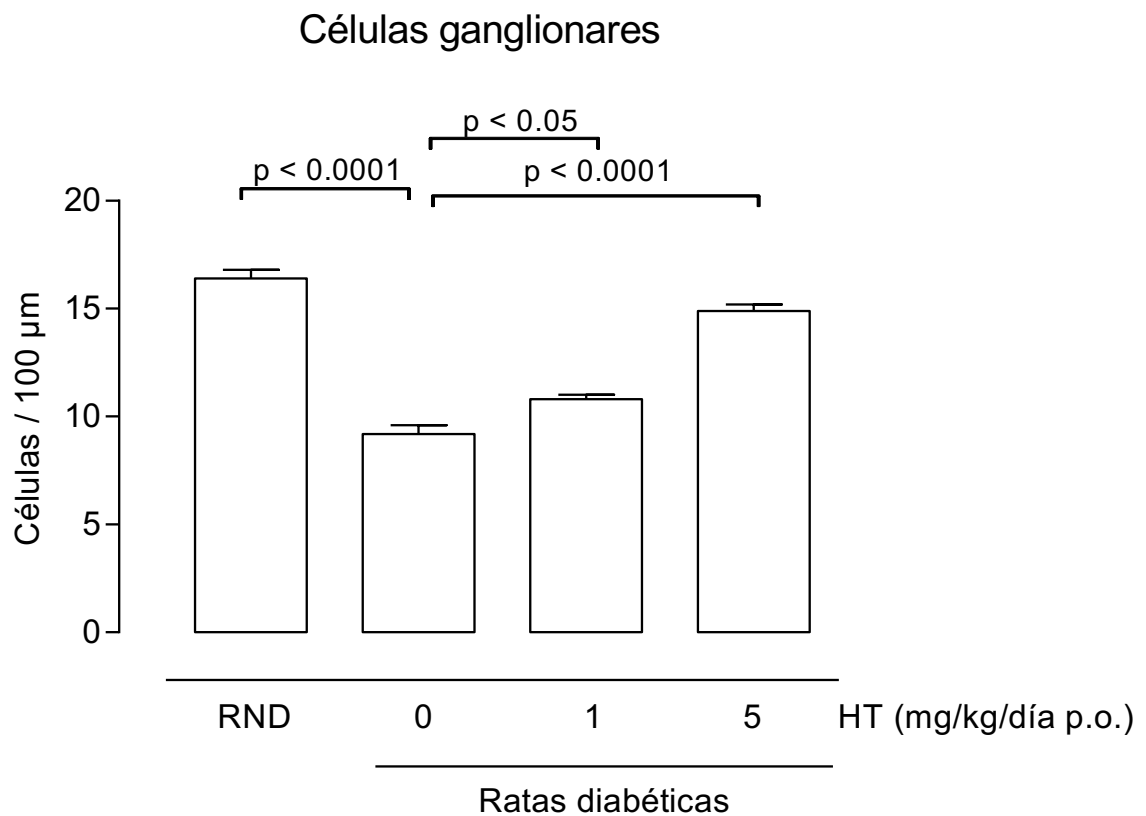


Figura 4.9. Número de células ganglionares en retinas de ratas no diabéticas (RND), ratas diabéticas (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT 1 y 5 mg/kg/día p.o. durante ocho semanas.



Tabla 4.11. Coeficientes de correlación de Pearson entre el número de células ganglionares retinianas y la intensidad máxima de agregación plaquetaria (Imax), tromboxano B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>), 6-keto prostaglandina F<sub>1α</sub> (6-keto-PGF<sub>1α</sub>), productos de reacción con ácido tiobabitérico (TBARS), colesterol-LDL oxidada (oxLDL), 3-nitrotirosina e interleucina 1β (IL-1β).

	Coeficiente de Pearson	p
Imax	- 0.868	0.0001
TxB <sub>2</sub>	- 0.672	0.003
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	0.965	0.0001
3-nitrotirosina	- 0.835	0.0001
TBARS	- 0.803	0.0001
oxLDL	- 0.817	0.0001
IL-1β	- 0.798	0.005



# DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Efecto de hidroxitirosol sobre la vasculopatía diabética

Nuestros resultados muestran que la administración de hidroxitirosol (HT) modificó algunos biomarcadores cardiovasculares en un modelo experimental de diabetes mellitus. Anteriormente habíamos observado que la administración de aceite de oliva virgen extra modificaba algunas variables plaquetarias y vasculares en este modelo experimental (De La Cruz et al., 2010). Tras la investigación realizada, identificamos que hidroxitirosol, el principal compuesto polifenólico del aceite de oliva virgen y virgen extra, puede ser responsable en parte de los efectos beneficiosos a nivel cardiovascular.

Uno de los primeros procesos bioquímicos que conducen a la vasculopatía diabética es el estrés oxidativo debido a la hiperglucemia crónica (Jansen et al., 2013; Shaw et al., 2014). Los resultados de nuestro modelo experimental confirman la influencia del estrés oxidativo, mediado por aumento de las concentraciones de peróxidos de lípidos y la reducción de la concentración de glutatión, en particular, y de la capacidad antioxidante total en plasma (Tabla 4.6). El hidroxitirosol modificó el estrés oxidativo a través de una reducción de los peróxidos lipídicos, un aumento de la concentración de glutatión y de la capacidad antioxidante total. El efecto antioxidante de hidroxitirosol se ha descrito ampliamente tanto en modelos químicos como biológicos (Granados-Principal, 2010; Raederstorff, 2009). Si el estrés oxidativo es uno de los pasos iniciales más importantes en la enfermedad vascular diabética, la inhibición del estrés oxidativo se convierte en un efecto importante a considerar para explicar el efecto beneficioso del hidroxitirosol sobre la disfunción endotelial y para prevenir potencialmente la vasculopatía (Storniolo et al., 2014).

Respecto a la producción de óxido nítrico, la diabetes mellitus aumenta los radicales de peroxinitritos y disminuye la producción constitutiva de óxido nítrico (Di Pietro et al., 2013; Cai et al., 2000). El hidroxitirosol redujo el estrés nitrosativo (Tabla 4.6) probablemente debido a su efecto antioxidante.

Una consecuencia importante del estrés oxidativo y nitrosativo en la vasculopatía diabética es el aumento de la oxidación de lipoproteínas como LDL (oxLDL) (Angeli et al., 2015). Los resultados del presente estudio confirman que los animales diabéticos

tenían concentraciones plasmáticas de oxLDL más altas que los animales normoglucémicos. El hidroxitirosol redujo la concentración de oxLDL en ratas diabéticas, un hallazgo consistente con otros estudios, en los que se demuestra que los polifenoles en el aceite de oliva virgen previenen la oxidación de LDL en sujetos sanos y personas con factores de riesgo cardiovascular (Castañer et al., 2012; Covas 2006). La oxidación de LDL es un paso clave en la génesis y evolución de la enfermedad arterial (Rafieian-Kopaei et al., 2014), por lo que proteger las LDL contra la oxidación es un efecto potencialmente beneficioso de los esfuerzos para prevenir las enfermedades cardiovasculares (Tousoulis et al., 2013).

Un aspecto relacionado con el estrés oxidativo es la participación de mediadores inflamatorios y citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6) en la aparición de la enfermedad vascular diabética. En las primeras etapas de la vasculopatía, el aumento de la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular se debe a un aumento de las proteínas adhesivas como la VCAM-1. La mieloperoxidasa (MPOx) también es indicador de la activación específica de estos leucocitos y, en este sentido, se sabe que las interleucinas participan en el desarrollo y evolución de la inflamación vascular (Stulc et al., 2012). En el presente estudio, observamos que los niveles de IL-1 $\beta$ , VCAM-1 y MPOx fueron más altos en animales diabéticos que en ratas normoglucémicas, resultados que sugieren la existencia de un estado inflamatorio en este modelo experimental (Tabla 4.8). El hidroxitirosol redujo significativamente estas variables (Tabla 4.8). Este efecto se ha descrito previamente en experimentos con cultivos de células endoteliales procedentes de la vena umbilical humana (Carluccio et al., 2007; Catalán et al., 2015; Dell'Agli et al., 2006) postulándose que hidroxitirosol regula negativamente el factor nuclear NF $\kappa$ B, disminuyendo así la expresión de estos mediadores. Por otro lado, se ha observado una reducción en la concentración de MPOx de casi el 75% en los neutrófilos circulantes inducidos en ratas (Quirantes-Piné et al., 2013), y también se encontraron reducciones en la pared intestinal en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal (Sánchez-Fidalgo et al., 2015). Con respecto a la producción de IL-1 $\beta$ , hemos observado que hidroxitirosol y tirosol reducen la interleucina-1 $\beta$  en cortes de cerebro de rata en un modelo de hipoxia-reoxigenación (De La Cruz et al., 2015), un resultado posiblemente relacionado con el mecanismo mencionado anteriormente sobre la regulación a la baja del factor nuclear NF $\kappa$ B (Killeen et al., 2014). Por tanto, hidroxitirosol puede reducir el

estado inflamatorio vascular tanto en estadios iniciales (activación leucocitaria) como durante la progresión de la enfermedad vascular (IL-1 $\beta$ ).

Una de las principales consecuencias de la inflamación vascular es la disfunción endotelial, que también implica alteraciones bioquímicas en la hiperglucemia crónica, principalmente en relación con el estrés oxidativo (de Zeeuw, 2015). Esta disfunción endotelial está representada por una disminución de la producción de prostaciclina y óxido nítrico (Schäfer et al., 2008) y, en segundo lugar, un aumento de la función plaquetaria (Schäfer et al., 2008). En el presente estudio hemos evidenciado un déficit en la producción de prostaciclina junto con una mayor actividad plaquetaria (agregación plaquetaria y producción de tromboxano B<sub>2</sub>) en animales diabéticos. Este desequilibrio fue compensado, en parte, por la administración de hidroxitirosol, que disminuyó la actividad plaquetaria y la producción de tromboxano B<sub>2</sub> de las plaquetas, y también redujo, en menor medida, la producción de prostaciclina endotelial. Este mismo perfil fue observado previamente en un estudio con muestras de sangre humana (González-Correa et al., 2009) y sangre de animales normoglucémicos. Probablemente el efecto observado sobre la prostaciclina sea indirecto, debido a que la acción antioxidante de la hidroxitirosol puede reducir el papel negativo de los radicales libres en la síntesis de prostaciclina (González-Correa et al., 2009).

En general, la administración de hidroxitirosol interfirió con los principales procesos bioquímicos que conducen a la vasculopatía diabética en el modelo experimental de diabetes mellitus.

## **5.2. Efecto de hidroxitirosol sobre la microangiopatía en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo1.**

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la administración de hidroxitirosol por vía oral durante 8 semanas a ratas con una diabetes experimental similar a la diabetes tipo 1 humana, disminuye las principales variables relacionadas con la microangiopatía producida por una hiperglucemia mantenida en el tiempo. Asimismo, se ha demostrado una relación de este efecto protector con su acción sobre la inflamación vascular.

En primer lugar, se podría plantear que el efecto de hidroxitirosol pudiera deberse a una normalización de los niveles de glucosa, hecho fundamental en la prevención de la

microangiopatía diabética. En este estudio no se ha observado esta reducción sobre los niveles de glucosa en sangre, por lo que los efectos observados para hidroxitirosol se deben a una acción directa sobre los mecanismos de daño vascular, renal y retiniano en la diabetes mellitus. Algunos estudios muestran un efecto antidiabético de hidroxitirosol (Poudyal et al., 2017), si bien se refieren a modelos de diabetes tipo 2 en los que el problema es la falta de sensibilidad a la insulina por los tejidos, hecho que no se produce en el modelo utilizado en nuestro estudio, ya que la estreptozotocina anula la capacidad del páncreas para producir insulina. En este sentido, la insulina administrada durante el experimento no pretendía normalizar los niveles de glucosa en sangre, sino evitar la mortalidad de los animales, al mismo tiempo que mantenía un estado de hiperglucemia, similar a lo que en el ser humano condiciona la aparición de microangiopatía diabética. Por otra parte, la polidipsia y polifagia que caracteriza a la diabetes mellitus tipo 1 no se vio modificada por la administración de hidroxitirosol (Fig 4.1).

En la génesis de la microangiopatía diabética los niveles altos de glucosa mantenidos en el tiempo originan una serie de cambios bioquímicos celulares que provocan cambios en la funcionalidad celular. Uno de esos cambios es la inducción de un estrés oxidativo celular (Fiorentino et al., 2013). El estrés oxidativo es reconocido como un punto principal para explicar dichas alteraciones celulares, modificando otras vías bioquímicas y llegando a producir, como hemos descrito en el apartado anterior, una disfunción endotelial que facilita el funcionamiento anómalo de los vasos sanguíneos, tanto grandes como pequeños (Incalza et al., 2018).

### **5.2.1. Nefropatía**

En relación con la nefropatía, un resultado que apoya la relación entre estos factores y una disfunción endotelial que pudiera participar en el daño glomerular es el desequilibrio que la diabetes produce en la formación de eicosanoides, elementos fundamentales para un correcto mantenimiento del flujo sanguíneo en distintos órganos (Hishinuma et al., 2001). Los animales diabéticos mostraron un incremento en la concentración de tromboxano (vasoconstrictor) y un descenso en la de prostaciclina (efecto vasodilatador), incrementando la cantidad de prostaglandinas que se generan por un incremento de radicales libres (8-isoprostanos) (Costabile et al., 2015). La administración de hidroxitirosol redujo la excreción urinaria de tromboxano y 8-

isoprostanos y frenó la disminución de la producción de prostaciclina (Tabla 4.5). El efecto de hidroxitirosol sobre el equilibrio tromboxano/prostaciclina ha sido demostrado en este mismo modelo experimental y en muestras de sangre humana (López-Villodres et al., 2016; Reyes et al., 2013). Respecto a la reducción de 8-isoprostanos se podría explicar por su efecto antioxidante, lo cual disminuiría la formación de prostaglandinas inducidas por radicales libres.

Los animales diabéticos presentan alteraciones en las principales variables analíticas relacionadas con una nefropatía (proteinuria y disminución del aclaramiento de creatinina), así como alteraciones morfológicas glomerulares (incremento del volumen glomerular y glomeruloesclerosis). La administración de hidroxitirosol redujo la proteinuria, el incremento de volumen glomerular y el índice de glomeruloesclerosis e incrementó el aclaramiento de creatinina (CrCl). La reducción de la proteinuria se asocia a una mejor evolución de la nefropatía (Sagoo et al., 2020), para lo cual es fundamental un control intensivo de la hiperglucemia (de Boer et al., 2011). No obstante, no siempre se consigue este control glucémico, por lo que es necesario encontrar fármacos o compuestos que faciliten este efecto protector. Por lo tanto, podemos aventurar que hidroxitirosol, administrado preventivamente, posee un efecto nefroprotector en el modelo experimental utilizado en este estudio.

En un modelo experimental de diabetes inducida con alloxan se ha demostrado que la administración de 20 mg/kg/día i.p. de un extracto purificado de hidroxitirosol durante 8 semanas, produce un efecto antioxidante y nefroprotector (observado cualitativamente) (Hamden et al., 2009). Por otra parte, se ha demostrado que la administración de hidroxitirosol reduce la nefrotoxicidad producida por fármacos como gentamicina (hidroxitirosol: 2 mg/kg/día p.o.) (Chashmi et al., 2017) o ciclosporina (hidroxitirosol: 20 x 2 mg/kg/día i.p.) (Capasso et al., 2008). Al ser la diabetes mellitus tipo 1 un proceso que dura toda la vida, pensamos que la administración oral de un compuesto potencialmente nefroprotector podría ser más útil para el cumplimiento de la medicación y el largo periodo de tiempo que debería ser administrado.

En la diabetes mellitus se ha observado en el riñón y en otros órganos un incremento del estrés oxidativo y nitrosativo, causando un aumento de las vías de inflamación celular y la expresión de factores de crecimiento (Jha et al., 2016). Todo ello origina un mal funcionamiento de los glomérulos y cambios morfológicos relacionados con un



incremento de la proliferación celular y la esclerosis glomerular (Jha et al., 2016). En el presente estudio hemos observado un claro aumento del estrés oxidativo y nitrosativo general, tanto en la circulación periférica como en el tejido renal de los animales diabéticos (Tablas 4.6 y 4.7). Este mismo perfil bioquímico se demostró en este mismo modelo experimental en tejido cerebral y en arterias periféricas de gran calibre (González-Correa et al., 2018; López-Villodres et al., 2016; Reyes et al., 2016).

Este incremento del estrés oxidativo (mayor daño oxidativo y menor defensa antioxidante) y nitrosativo (incremento en la concentración de 3-nitrotirosina) se ve reducido por la administración precoz de hidroxitirosol, tanto a nivel periférico (niveles séricos) como en tejido renal. Similar comportamiento se ha demostrado en este mismo modelo experimental en tejido cerebral (Reyes et al., 2016). El efecto antioxidante y sobre el estrés nitrosativo de hidroxitirosol ha sido ampliamente demostrado en diversos tejidos y en distintos modelos experimentales, adjudicando a este efecto los beneficios de hidroxitirosol como compuesto órgano-protector (Bertelli et al., 2020).

Por lo tanto, se podría postular que hidroxitirosol ejerce un efecto nefroprotector, al menos en parte, por su acción antioxidante general y a nivel renal. Esta hipótesis se puede fundamentar en la correlación encontrada entre las distintas variables de estrés oxidativo y nitrosativo y tres variables renales representativas del daño renal (proteinuria, aclaramiento de creatinina y volumen glomerular) (Tabla 4.9). Estas correlaciones demostrarían que las modificaciones realizadas en el estrés oxidativo y nitrosativo influyen sobre la función renal en este modelo de diabetes experimental, en lo referente al daño producido por la diabetes y a la prevención de dicho daño tras la administración oral de hidroxitirosol.

Otros compuestos con potencial antioxidante han demostrado un efecto nefroprotector en modelos experimentales de diabetes, tanto de origen natural (Giribabu et al., 2017) como farmacológico (Abdelrahman et al., 2020; Al-Rasheed et al., 2018), adjudicando a este mecanismo una importancia fundamental para explicar su nefroprotección a nivel morfológico y funcional. Nuestro estudio aporta un efecto nefroprotector, en relación con su acción antioxidante, de hidroxitirosol, el principal compuesto polifenólico del aceite de oliva virgen.

### 5.2.2. Retinopatía

Nuestro estudio ha demostrado por primera vez el efecto protector del hidroxitirosol sobre las alteraciones de las células retinianas en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1.

Previamente se había demostrado un efecto protector *in vitro* sobre las células epiteliales del pigmento de la retina (Granner et al., 2013; Zou et al., 2012; Liu et al., 2007).

La hiperglucemia produce una microangiopatía retiniana y esta induce daño en el tejido neuronal retiniano, pero esta hiperglucemia también daña directamente el tejido nervioso y hay que recordar que la retina es un complejo vascular-nervioso. La pregunta es si el daño vascular es anterior en el tiempo al neuronal o si es simultáneo (Villarreal et al., 2010; Zhang et al., 2013). En esto radica la importancia del daño directo de la hiperglucemia a las células nerviosas de la retina, en este sentido, algunos autores consideran la retinopatía diabética como un proceso neurodegenerativo en la evolución de la diabetes mellitus (Ozawa et al., 2011; Payne et al., 2014). Nuestros resultados van en la línea con los aportados por otros grupos en la literatura utilizando el mismo modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 como (Ozawa et al., 2011).

En nuestro estudio hemos evidenciado un aumento en el grosor de la retina en los animales diabéticos, lo que no coincide con los trabajos mencionados anteriormente. Se ha descrito que en este modelo experimental se produce un aumento de la permeabilidad de la barrera hemato-retiniana, produciendo lo que en el humano corresponde a edemas retinianos (Abdouh et al. 2008). Esta hipótesis se puede confirmar indirectamente por el hecho de que el área retiniana ocupada por matriz extracelular es mayor en animales diabéticos que en animales normoglucémicos (Figura 4.7), pudiendo explicar el mayor grosor total de retinas observado en estos animales.

Respecto a la disminución del número de células ganglionares, es la evidencia más clara de la neurotoxicidad retiniana de la diabetes mellitus experimental, coincidiendo también con los estudios publicados (Ozawa et al., 2011). En cuanto al tamaño de las células retinianas, un aumento en el tamaño de estas células podría ser consecuencia del edema tisular descrito en la retinopatía diabética y que conduciría a una disfunción de estos tipos celulares (Toyoda et al., 2016). Por tanto, los animales diabéticos mostraron

daño neuronal retiniano. En este mismo modelo experimental de diabetes se ha demostrado que el tejido cerebral es más sensible al daño neuronal producido por isquemia-reperfusión en comparación con los animales normoglucémicos (González-Correa et al., 2006; Reyes et al., 2017).

En términos generales, podríamos definir el efecto del hidroxitirosol como neuroprotector. Los principales cambios fueron los siguientes: reduce significativamente las alteraciones en el grosor de la retina (grosor total, superficies de células y matriz), ralentiza la pérdida de células ganglionares y de la capa nuclear externa, especialmente con la dosis de 5 mg/kg/día y reduce el tamaño de las células de la retina. Este efecto beneficioso de hidroxitirosol sobre las alteraciones retinianas en la diabetes experimental puede deberse a un efecto también beneficioso sobre las alteraciones vasculares de la diabetes y su efecto neuroprotector directo. Podemos pensar que existan algunos datos de citoprotección indirecta, tal como se ha demostrado en modelos isquémicos en hígado (Pan et al., 2013) o en tejido cerebral (Cabrerizo et al., 2013, González-Correa et al., 2008). En el modelo experimental de diabetes tipo 1 se ha demostrado un efecto protector de lesiones vasculares macroangiopáticas (López-Villodres et al., 2016) y neuroprotector en cortes de cerebro de rata (Reyes et al., 2017).

En definitiva, en los animales tratados con hidroxitirosol, el grosor total de la retina es estadísticamente igual al de los animales no diabéticos, y este efecto puede explicarse por la suma de un efecto neuroprotector y antiedematoso. Este efecto ha sido demostrado en un modelo experimental de hemorragia subaracnoidea, en el que se reduce la intensidad del edema cerebral tras el tratamiento con hidroxitirosol (Zhong et al., 2016).

Independientemente del efecto protector directo del hidroxitirosol sobre el tejido de la retina, no debe descartarse un posible efecto sobre la microcirculación vascular. Tomando como variable más significativa del daño neuronal de la diabetes la disminución del número de células ganglionares de la retina, pudimos comprobar que en la modificación de esta variable se correlaciona con la producción de prostaciclina y la agregación plaquetaria.

Respecto a la prostaciclina, en este mismo modelo experimental, se ha demostrado, en una serie de estudios farmacológicos (incluida la administración de aceite de oliva

virgen), que la protección de la vascularización retiniana era proporcional al grado en que los fármacos utilizados respetaban la producción vascular de prostaciclina (De La Cruz et al., 2010; Moreno et al., 1995). También se demostró en muestras de sangre de pacientes diabéticos con diferentes tipos de retinopatía, la implicación de la prostaciclina y su efecto antiplaquetario en relación a la intensidad y evolución de estos pacientes (De La Cruz et al., 2001, 2002). Por tanto, podríamos postular que el hidroxitirosol, ejerciendo un efecto protector (al menos desde el punto de vista bioquímico) de la producción endotelial de prostaciclina, disminuye la posibilidad de fenómenos retinianos isquémicos vasculares y esto podría ayudar a la neuroprotección cuantificada en nuestro estudio. Este efecto se ve reforzado por la relación negativa entre el número de células ganglionares y la intensidad máxima de agregación plaquetaria. Se ha demostrado un claro efecto antiplaquetario del hidroxitirosol tanto en sangre humana como tras la administración oral a animales de experimentación (González-Correa et al., 2009, López-Villodres et al., 2016).

Se ha demostrado que la formación de peroxinitritos en varios modelos de diabetes experimental es un factor importante en el daño neurovascular retiniano, principalmente al facilitar la activación de mediadores inflamatorios en la retina (Liu et al., 2013), un desequilibrio entre pro-NGF y NGF, que provoca un efecto neurotóxico en las células nerviosas de la retina (Ali et al., 2011) o una regulación a la baja de factores como la poli (ADP-ribosa) polimerasa a nivel nuclear, produciendo un efecto neurotóxico en la retina (Pacher et al., 2005). Por otro lado, el efecto pro-oxidante de los peroxinitritos y su efecto inhibidor directo de la actividad de la prostaciclina-sintetasa (Schildknecht & Ullrich, 2009) y el estimulante de la tromboxano sintetasa plaquetaria, activando así la capacidad de agregación de las plaquetas (Schildknecht et al., 2008), influirían a nivel vascular sobre la retinopatía diabética. Se ha demostrado previamente que el hidroxitirosol inhibe la formación y los efectos de los peroxinitritos mediante un efecto neutralizante directo de los radicales derivados del óxido nítrico (Rietjens et al., 2007) y un efecto inhibidor de la nitración de proteínas (Deiana et al., 1999). Ambos procesos parecen ser independientes de su efecto antioxidante (Chen et al., 2013). También en el mismo modelo experimental de diabetes, se ha demostrado que el hidroxitirosol disminuye la producción de peroxinitrito en muestras de sangre y tejido cerebral bajo hipoxia-reoxigenación (López-Villodres et al., 2016; Reyes et al., 2017).

Finalmente, el efecto de hidroxitirosol como protector de las alteraciones retinianas en el modelo experimental de diabetes, puede relacionarse nuevamente con la dualidad de un posible efecto vascular o tisular nervioso, ya que en estudios previos en este mismo modelo experimental, se observó una tendencia a un mayor efecto neuroprotector cerebral tras la administración de 5 mg/kg/día (Reyes et al., 2017) y un mayor efecto protector vascular con dosis de 1 mg/kg/día e incluso menores (López- Villodres et al., 2016).

Aunque las variables bioquímicas cardiovasculares anteriormente descritas permiten predecir estadísticamente alteraciones en el número de células ganglionares retinianas. La administración de hidroxitirosol también modifica otras variables que influyen en el nivel de vasculopatía diabética, como el tromboxano plaquetario, el estrés oxidativo y la producción de interleucina-1 $\beta$  (López-Villodres et al., 2016). Para establecer el posible papel de la modificación de estas variables tras la administración de hidroxitirosol en las alteraciones microangiopáticas retinianas en la diabetes mellitus, se requieren experimentos de investigación más específicos sobre estos aspectos.

En términos generales, aunque nuestros resultados puedan tener aplicaciones clínicas en los esfuerzos por prevenir la vasculopatía diabética, se necesitarán estudios adicionales para determinar si la incidencia de eventos vasculares disminuye en pacientes con diabetes que toman hidroxitirosol diariamente.



# CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

Del análisis pormenorizado de los resultados obtenidos en el presente estudio, hemos extraído las siguientes conclusiones:

1. La administración oral de hidroxitirosol a animales sometidos a un modelo experimental de diabetes mellitus similar a la diabetes tipo 1 en humanos, frena el desequilibrio bioquímico cuantificado en los animales diabéticos controles: estrés oxidativo, nitrosativo y estado proinflamatorio.
2. La administración oral de 1 y 5 mg/kg/día de hidroxitirosol produce un efecto antioxidante y nefroprotector en tejido renal en dicho modelo experimental de diabetes mellitus.
3. El efecto nefroprotector se relaciona estadísticamente con su acción antioxidante sistémica y en el tejido renal, así como su efecto sobre el equilibrio tromboxano/prostaciclina.
4. Hidroxitirosol ejerce un efecto neuroprotector sobre la retina de los animales diabéticos.
5. El efecto protector retiniano, se relacionan estadísticamente con algunas variables bioquímicas cardiovasculares: producción de nitrotirosina e intensidad máxima de agregación plaquetaria.







# BIBLIOGRAFÍA



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelrahman AM, Al Salam S, Al Suleimani Y, Ashique M, Manoj P, Ali BH. Effect of levosimendan, an inodilator, on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol.* 2020, 873:172960.
- Abdough M, Talbot S, Couture R, Hasséssian HM. Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol.* 2008, 154: 136-143.
- Ali TK, Al-Gayyar, MM, Matragoon S, Pillai BA, Abdelsaid MA, Nussbaum JJ, El-Remessy AB. Diabetes-induced peroxynitrite impairs the balance of pro-nerve growth factor and nerve growth factor, and causes neurovascular injury. *Diabetologia.* 2011, 54: 657-668.
- Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017, 12: 2032-2045.
- Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Bassiouni YA, Hasan IH, Al-Amin MA, Al-Ajmi HN, Mahmoud AM. Simvastatin ameliorates diabetic nephropathy by attenuating oxidative stress and apoptosis in a rat model of streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Biomed Pharmacother.* 2018,105: 290-298.
- Al-Waili N, Al-Waili H, Al-Waili T, Salom K. Natural antioxidants in the treatment and prevention of diabetic nephropathy; a potential approach that warrants clinical trials. *Redox Rep.* 2017, 22: 99-118.
- Angeli F, Reboldi G, Poltronieri C, Lazzari L, Sordi M, Garofoli M, Bartolini C, Verdecchia P. Hyperglycemia in acute coronary syndromes: from mechanisms to prognostic implications. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2015, 9: 412-424.
- Aparicio-Soto M, Sánchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Rosillo MÁ, Sánchez-Fidalgo S, Utrilla J, Martín-Lacave I, Alarcón-de-la-Lastra C. Dietary extra virgin olive oil attenuates kidney injury in pristane-induced SLE model via activation of HO-1/Nrf-2 antioxidant pathway and suppression of JAK/STAT, NF-κB and MAPK activation. *J Nutr Biochem.* 2016, 27: 278-288.
- Arpón A, Milagro FI, Razquin C, Corella D, Estruch R, Fitó M, et al. Impact of Consuming Extra-Virgin Olive Oil or Nuts within a Mediterranean Diet on DNA Methylation in Peripheral White Blood Cells within the PREDIMED-Navarra Randomized Controlled Trial: A Role for Dietary Lipids. *Nutrients.* 2017, 10 (1): 15.
- Babio N, Toledo E, Estruch R, Ros E, Martínez-González MA, Castañer O, et al. PREDIMED Study Investigators. Mediterranean diets and metabolic syndrome status in the PREDIMED randomized trial. *CMAJ.* 2014, 186: E649-657.
- Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, et al. Mediterranean diet pyramid today. Science and Cultural updates. *Public Health Nutr.* 2011,14: 2274–2284.

- Berry E. M, Arnoni Y., Aviram M. “The Middle Eastern and biblical origins of the Mediterranean diet”. *Public Health Nutr.* 2011, 14: 2288–2295.
- Bertelli M, Kiani AK, Paolacci S, Manara E, Kurti D, Dhuli K, Bushati V, Miertus J, Pangallo D, Baglivo M, Beccari T, Michelini S. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *J Biotechnol.* 2020, 309: 29-33.
- Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis.* 2007, 190: 181–186.
- Bonazzi M. Entre hombres y dioses en el Mediterráneo. Introducción a la cultura del olivo, Jaén. 1999.
- Boss A, Kao CH-J, Murray PM, Marlow G, Barnett MPG, Ferguson LR et al. Human Intervention Study to Assess the Effects of Supplementation with Olive Leaf Extract on Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression. *Int J Mol Sci.* 2016, 17: 2019.
- Burlingame B, Dernini S. Sustainable diets: the Mediterranean diet as an example. *Public Health Nutr.* 2011, 14 (Special Issue 12A): 2285–2287.
- Cabrerizo S, De La Cruz JP, López-Villodres JA, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Reyes JJ, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *J Nutr Biochem.* 2013, 24: 2152-2157.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2000, 87:840–844.
- Capasso G, Di Gennaro CI, Della Ragione F, Manna C, Ciarcia R, Florio S, Perna A, Pollastro RM, Damiano S, Mazzoni O, Galletti P, Zappia V. In vivo effect of the natural antioxidant hydroxytyrosol on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2008, 23: 1186-1195.
- Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distanto A, Storelli C, De Caterina R. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007, 293: H2344-H2354.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23: 622–629.
- Caruso D, Berra B, Giavarini F, Cortesi N et al. Effect of virgin olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 1999, 9: 102–107.

- Casas R, Sacanella E, Urpí-Sardà M, Chiva-Blanch G, Ros E, Martínez-González MA, et al. The effects of the mediterranean diet on biomarkers of vascular wall inflammation and plaque vulnerability in subjects with high risk for cardiovascular disease. A randomized trial. *PLoS One*. 2014, 9 (6). p. e100084.
- Casas R, Sacanella E, Urpí-Sardà M, Corella D, Castañer O, Lamuela-Raventos RM, et al. Long-Term Immunomodulatory Effects of a Mediterranean Diet in Adults at High Risk of Cardiovascular Disease in the PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) Randomized Controlled Trial. *J Nutr*. 2016, 146: 1684-1693.
- Castañer O, Covas MI, Khymenets O, Nyyssönen K, Konstantinidou V, Zunft HF, de la Torre R, Muñoz-Aguayo D, Vila J, Fitó M. Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products in vivo in humans. *Am J Clin Nutr*. 2012, 95: 1238-1244.
- Castañer O, Fitó M, López-Sabater M. C, Poulsen H. E, Nyyssönen K, Schröder H, et al. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr*. 2011, 30: 490-493.
- Catalán Ú, López de Las Hazas MC, Rubió L, Fernández-Castillejo S, Pedret A, de la Torre R, Motilva MJ, Solà R. Protective effect of hydroxytyrosol and its predominant plasmatic human metabolites against endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*. 2015, 59: 2523-2536.
- Ceriello A, Esposito K, La Sala L, Pujadas G, De Nigris V, Testa R, et al. The protective effect of the Mediterranean diet on endothelial resistance to GLP-1 in type 2 diabetes: a preliminary report. *Cardiovasc Diabetol*. 2014, 13: 140.
- Chashmi NA, Emadi S, Khastar H. Protective effects of hydroxytyrosol on gentamicin induced nephrotoxicity in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017, 482: 1427-1429.
- Chen XM, Chen HS, Xu MJ, Shen JG. Targeting reactive nitrogen species: a promising therapeutic strategy for cerebral ischemia-reperfusion injury. *Acta Pharmacol. Sin*. 2013, 34: 67-77.
- Chiva-Blanch G, Magraner E, Condines X, Valderas-Martínez P, Roth I, Arranz S, et al. Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: a randomized feeding trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015, 25: 36-45.
- Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *Int J Mol Sci*. 2010, 11: 458-479.
- Cicero AFG, Nascetti S, López-Sabater MC, Elosua R, Salonen JT, Nyyssönen K, et al. Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: The EUROLIVE study. *J Am Coll Nutr*. 2008, 27: 314-320.

- Collaboration NCDRF. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet*. 2016, 387: 1513–1530.
- Costabile G, Della Pepa G, Bozzetto L, Annuzzi G, Vetrani C, Giacco R, Della Corte G, Conte FS, Di Marino L, Rivellese AA. Urine 8-isoprostane in relation to adiposity and insulin resistance in individuals at high cardiometabolic risk. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015, 13: 187-191.
- Courtney RD, Bryan J, Hodgson JM, Wilson C, Dhillon V, Murphy KJ. A randomised controlled intervention trial evaluating the efficacy of an Australianised Mediterranean diet compared to the habitual Australian diet on cognitive function, psychological wellbeing and cardiovascular health in healthy older adults (MedLey study): protocol paper. *BMC Nutr*. 2015, 1, 35(2015).
- Covas MI. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol. Res*. 2007, 55: 175–186.
- Covas MI, de la Torre K, Farré-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fitó M, López-Sabater C, ... de la Torre R. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Rad Biol Med*. 2006, 40: 608–616.
- Covas MI, de la Torre R, Fitó M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *Br J Nutr*. 2015, 113 (Suppl 2): S19-28.
- Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Bäumler H, Nascetti S, Salonen JT, Fitó M, Virtanen J, Marrugat J, EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006, 145: 333-341.
- de Bock M, Derraik JG, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PloS One*. 2013; 8(3): e57622
- de Boer IH, Sun W, Cleary PA, Lachin JM, Molitch ME, Steffes MW et al. Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2011, 365: 2366–2376.
- Deiana M, Aruoma OI, Bianchi ML, Spencer JP, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi MA, Corongiu FP. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Rad. Biol. Med*. 1999, 26: 762-769.
- De La Cruz JP, Del Río S, López-Villodres JA, Villalobos MA, Jebrouni N, González-Correa JA. Virgin olive oil administration improves the effect of aspirin on retinal vascular pattern in experimental diabetes mellitus. *Br J Nutr*. 2010, 104: 560-565.

- De La Cruz, J.P., Moreno, A., Guerrero, A., Ortega, G., González-Correa, J.A., Sánchez de la Cuesta, F. Nitric oxide-cGMP and prostacyclin-cAMP pathways in patients with type II diabetes and different types of retinopathy. *Pathophysiol Haemostas Thromb.* 2002, 32: 25-32.
- De La Cruz JP, Moreno A, Guerrero A, Sánchez de la Cuesta F. Antiplatelet effects of prostacyclin and nitric oxide in patients with type I diabetes and ischemic or edematous retinopathy. *Platelets.* 2001, 12: 210-217.
- De La Cruz JP, Quintero L, Villalobos MA, Sánchez de la Cuesta F. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim Biophys Acta.* 2000a, 1485: 36-44.
- De La Cruz JP, Ruiz-Moreno MI, Guerrero A, López-Villodres JA, Reyes JJ, Espartero JL, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *J Nutr Biochem.* 2015a, 26: 549-555.
- De La Cruz JP, Ruiz-Moreno MI, Guerrero A, Reyes JJ, Benitez-Guerrero A, Espartero JL, González-Correa JA. Differences in the Neuroprotective Effect of Orally Administered Virgin Olive Oil (*Olea europaea*) Polyphenols Tyrosol and Hydroxytyrosol in Rats. *J Agric Food Chem.* 2015b, 63: 5957-5963.
- De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martín-Romero M, Smith-Agreda JM, Sánchez de la Cuesta F. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thromb Res.* 2000b, 100: 305-315.
- de la Torre-Carbot K, Chávez-Servín JL, Jaúregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, Nurmi T, et al. Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *J Nutr.* 2010, 140: 501-508.
- de Zeeuw P, Wong BW, Carmeliet P. Metabolic adaptations in diabetic endothelial cells. *Circ J.* 2015, 79: 934-941.
- Dell'Agli M, Fagnani R, Mitro N, Scurati S, Masciadri M, Mussoni L, Galli GV, Bosisio E, Crestani M, De Fabiani E, Tremoli E, Caruso D. Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *J Agric Food Chem.* 2006, 54: 3259-3264.
- Dell'Agli M, Maschi O, Galli GV, Fagnani R, Dal Cero E, Caruso D, Bosisio E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *Br. J. Nutr.* 2008, 99: 945-951.
- Di Giovacchino L, Sestili S, Di Vincenzo D. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Tech.* 2002, 104: 587-601.
- Di Pietro N, Di Tomo P, Di Silvestre S, Giardinelli A, Pipino C, Morabito C, Formoso G, Mariggiò MA, Pandolfi A. Increased iNOS activity in vascular smooth muscle



- cells from diabetic rats: potential role of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKII $\delta$ (2)). *Atherosclerosis*. 2013, 226: 88-94.
- Di Vaio C, Nocerino S, Paduano A, Sacchi R. Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition. *J Sci Food Agric*. 2013, 93: 1134–1139.
- Droste DW, Iliescu C, Vaillant M, Gantenbein M, De Bremaeker N, Lieunard C, et al. A daily glass of red wine associated with lifestyle changes independently improves blood lipids in patients with carotid arteriosclerosis: results from a randomized controlled trial. *Nutr J*. 2013, 12: 147.
- EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies Guidance on the scientific requirements for health claims related to appetite ratings, weight management, and blood glucose concentrations. *EFSA J*. 2012, 10: 2604.
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013, 368: 1279-1290.
- Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A. Production in large quantities of highly purified hidroxitirosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or “Alperujo”. *J Agric Food Chem*. 2002, 50: 6804-6811.
- Fernández-Castillejo, S., Valls, R.-M., Castañer, O., Rubió, L., Catalán, Ú., Pedret, A, et al. Polyphenol Rich Olive Oils improve Lipoprotein Particle Atherogenic Ratios and Subclasses Profile: A Randomized, Crossover, Controlled Trial. *Mol Nutr Food Res*. 2016, 60: 1544–1554.
- Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des*. 2013,19: 5695-5703.
- Fitó M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, Torrents L, de la Torre C et al. Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids*. 2000, 35: 633–638.
- Fitó M, De la Torre R, Covas MI. Olive oil and oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res*. 2007b, 51: 1215–1224.
- Fitó M, de la Torre R, Farré-Albaladejo M, Khymenetz O, Marrugat J, Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Annali dell’Istituto Superiore Di Sanità*. 2007c, 43: 375–381.
- Fitó M, Estruch R, Salas-Salvadó J, Martínez-González MA, Arós F, Vila J, et al. Effect of the Mediterranean diet on heart failure biomarkers: a randomized sample from the PREDIMED trial. *Eur J Heart Fail*. 2014, 16: 543–550.

- Fitó M, Guxens M, Corella D, Saez G, Estruch R, de la Torre, R et al. Effect of a tradicional mediterranean diet on lipoprotein oxidation. A randomized controlled trial. *Arch. Intern. Med.* 2007a, 167: 1195–1203.
- Gajendragadkar PR, Hubsch A, Mäki-Petäjä KM, Serg M, Wilkinson IB, Cheriyan J, et al. Effects of oral lycopene supplementation on vascular function in patients with cardiovascular disease and healthy volunteers: a randomised controlled trial. *PLoS One.* 2014, 9 (6). p. e99070.
- Gardener H, Wright CB, Cabral D, Scarmeas N, Gu, Y, Cheung K, et al. Mediterranean diet and carotid atherosclerosis in the Northern Manhattan Study. *Atherosclerosis.* 2014, 234: 303-310.
- Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *Int J Mol Sci.* 2012, 13: 3291–3340.
- Ghorbel I, Elwej A, Fendri N, Mnif H, Jamoussi K, Boudawara T, Grati Kamoun N, Zeghal N. Olive oil abrogates acrylamide induced nephrotoxicity by modulating biochemical and histological changes in rats. *Ren Fail.* 2017, 39: 236-245.
- Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Salleh N. *Phyllanthus niruri* leaves aqueous extract improves kidney functions, ameliorates kidney oxidative stress, inflammation, fibrosis and apoptosis and enhances kidney cell proliferation in adult male rats with diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol.* 2017, 205: 123-137.
- Gnudi L, Thomas SM, Viberti G. Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism. *J Am Soc Nephrol.* 2007, 18: 2226–2232.
- González-Correa JA, Arrebola MM, Cansino AL, Muñoz-Marín J, Ruiz-Villafranca D, Guerrero A, Sánchez de la Cuesta F, De La Cruz JP. Effects of hypoxia reoxygenation in brain slices from rats with type 1-like diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006, 22: 390-400.
- González-Correa JA, López-Villodres JA, Asensi R, Espartero JL, Rodríguez-Gutiérrez G, De La Cruz JP. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Br J Nutr.* 2009, 101: 1157-1164.
- González-Correa JA, Navas MD, Lopez-Villodres JA, Trujillo M, Espartero JL, De La Cruz JP. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neurosci Lett.* 2008, 446: 143–146.
- González-Correa JA, Navas MD, Muñoz-Marín J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, de la Cruz JP. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J Agric Food Chem.* 2008, 56: 7872-7876.

- González-Correa JA, Rodríguez-Pérez MD, Márquez-Estrada L, López-Villodres JA, Reyes JJ, Rodríguez-Gutierrez G, Fernández-Bolaños J, De La Cruz JP. Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol in Experimental Diabetic Retinopathy: Relationship with Cardiovascular Biomarkers. *J Agric Food Chem*. 2018, 66: 637-644.
- Granner T, Maloney S, Antecka E, Correa JA, Burnier MN Jr. 3,4 dihydroxyphenyl ethanol reduces secretion of angiogenin in human retinal pigment epithelial cells. *Br J Ophthalmol*. 2013, 97: 371-374.
- Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev*. 2010, 68: 191-206.
- Grignaffini P, Roma P, Galli C, Catapano A. L. Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol. *Lancet*. 1994, 343: 1296–1297.
- Guasch-Ferré M, Bulló M, Martínez-González MA, Ros E, Corella D, Estruch R, et al. Frequency of nut consumption and mortality risk in the PREDIMED nutrition intervention trial on behalf of the PREDIMED study group. *BMC Med*. 2013, 11: 164.
- Guasch-Ferre M, Hu FB, Martinez-Gonzalez MA, Fito M, Bullo M, Estruch R, et al. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED study. *BMC Med*. 2014, 12: 78.
- Guerrero A, De la Cruz JP, Muñoz-Marín J, López-Villodres JA, Madrona A, Espartero JL, González-Correa JA. Neuroprotective effect of alkyl hydroxytyrosyl ethers in rat brain slices subjected to a hypoxia-reoxygenation model. *Food Chem*. 2012, 134: 2176-2183.
- Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem Biol Interact*. 2009, 180: 421-432.
- Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci*. 2007, 8: 950–988.
- Hannachi H, Breton C, Msallem M, Ben El Hadj S, El Gazzah M, Bervillé A. Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. *Sci Horticulturae*. 2008, 116: 280–290.
- Heitzer T, Just H, Münzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996, 94: 6–9.
- Hernáez A, Fernández-Castillejo S, Farràs M, Catalán Ú, Subirana I, Montes R, et al. "Olive Oil Polyphenols Enhance High-Density Lipoprotein Function in Humans A Randomized Controlled Trial." *Arteriosclerosis, Thromb Vasc Biol*. 2014, 34: 2115-2119.

- Hernández, Á., Remaley, A. T., Farràs, M., Fernández-Castillejo, S., Subirana, I., Schröder, H, et al. Olive Oil Polyphenols Decrease LDL Concentrations and LDL Atherogenicity in Men in a Randomized Controlled Trial. *J Nutr.* 2015, 145: 1692–1697.
- Hishinuma T, Tsukamoto H, Suzuki K, Mizugaki M. Relationship between thromboxane/prostacyclin ratio and diabetic vascular complications. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2001, 65: 191-196.
- Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Smidt UM, Parving HH. Progression of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2001, 59: 702–709.
- Imamura H, Yamaguchi T, Nagayama D, Saiki A, Shirai K, Tatsuno I, et al. Resveratrol Ameliorates Arterial Stiffness Assessed by Cardio-Ankle Vascular Index in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Int Heart J.* 2017, 58: 577-583.
- Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018, 100: 1-19.
- Jackson TS, Xu A, Vita JA, Keaney JF Jr. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ. Res.* 1998, 83: 916– 922.
- Jha JC, Banal C, Chow BSM, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 2016, 25: 657-684.
- Keaney JF Jr, Vita JA. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1995, 38:129–154.
- Killeen MJ, Linder M, Pontoniere P, Crea R. NF- $\kappa$ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discov Today.* 2014, 19: 373-378.
- Kris-Etherton, P., Eckel, R. H., Howard, B. V., St Jeor, S., Bazzarre, T. L., & Nutrition Committee Population Science Committee and Clinical Science Committee of the American Heart Association. AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2001, 103: 1823–1825.
- Lane PH, Steffes M W, Mauer SM. Estimation of glomerular volume: a comparison of four methods. *Kidney International.* 1992, 41: 1085–1089.
- Lasa A, Miranda J, Bulló M, Casas R, Salas-Salvadó J, Larretxi I, Estruch R, Ruiz-Gutiérrez V, Portillo MP. Comparative effect of two Mediterranean diets versus a low-fat diet on glycaemic control in individuals with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 2014, 68: 767-772.

- Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF Jr, Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996, 93: 1107–1013.
- Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014, 237: 208-219.
- Liu Q, Li J, Cheng R, Chen Y, Lee K, Hu Y, Yi J, Liu Z, Ma JX. Nitrosative stress plays an important role in Wnt pathway activation in diabetic retinopathy. *Antioxid Redox Signal*. 2013, 18: 1141-1153.
- Liu Z, Sun L, Zhu L, Jia X, Li X, Jia H, Wang Y, Weber P, Long J, Liu J. Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J Neurochem*. 2007, 103: 2690-2700.
- Lloyd-Jones DM, Hong Y, Labarthe D, et al. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. *Circulation*. 2010, 121: 586–613.
- López-Villodres JA, Abdel-Karim M, De La Cruz JP, Rodríguez-Pérez MD, Reyes JJ, Guzmán-Moscoso R, Rodríguez-Gutierrez G, Fernández-Bolaños J, González-Correa JA. Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. *J Nutr Biochem*. 2016, 37: 94-100.
- Lucas A. *Ancient Egyptian Materials and Industries*. Kessinger Publishing. Whitefish MT. 2010.
- Maki KC, Lawless AL, Kelley KM, Kaden VN, Geiger CJ, Dicklin MR. Corn oil improves the plasma lipoprotein lipid profile compared with extra-virgin olive oil consumption in men and women with elevated cholesterol: Results from a randomized controlled feeding trial. *J Clin Lipidol*. 2015, 9: 49-57.
- Marcelino G, Hiane PA, Freitas KC, Santana LF, Pott A, Donadon JR, Guimarães RCA. Effects of Olive Oil and Its Minor Components on Cardiovascular Diseases, Inflammation, and Gut Microbiota. *Nutrients*. 2019, 11: 1826-1840.
- Martín-Peláez S, Covas MI, Fitó M, Kušar A, Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res*. 2013, 57: 760-771.
- Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E; PREDIMED INVESTIGATORS. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015, 58: 50-60.
- Martínez-González MA, Toledo E, Arós F, Fiol M, Corella D, Salas-Salvadó J, et al. Extravirgin olive oil consumption reduces risk of atrial fibrillation: the PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) trial *Circulation*. 2014, 130: 18–26.

- Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Ríos JJ, León-Camacho M, Alcudia F, Cert A. Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J Agric Food Chem*. 2001, 49: 2185-2192.
- Mayneris-Perxachs J, Sala-Vila A, Chisaguano M, Castellote AI, Estruch R, Covas MI, et al. Effects of 1-year intervention with a Mediterranean diet on plasma fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk. *PloS One*. 2014, 9 (3). p. e85202.
- Medina F. "Food consumption and civil society: Mediterranean diet as a sustainable resource for the Mediterranean area". *Public Health Nutr*. 2011, 14: 2346–2349.
- Medina-Remón A, Tresserra-Rimbau A, Pons A, Tur JA, Martorell M, Ros E, et al. Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015, 25: 60–67.
- Mitjavila MT, Fandos M, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Borrego S, Estruch R, et al. The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial. *Clin Nutr*. 2013, 32: 172–178.
- Muniz FJS. (2009). Aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 2009, 73(3). Retrieved from <http://analesranf.com/index.php/aranf/article/view/100>.
- Muñoz-Marín J, De La Cruz JP, Guerrero A, López-Leiva I, López-Villodres JA, Reyes JJ, Espartero JL, Madrona A, Labajos MT, González-Correa JA. Cytoprotective effect of hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives after oral administration to rats in a model of glucose-oxygen deprivation in brain slices. *J Agric Food Chem*. 2012, 60: 7659-7564.
- Muñoz-Marín J, De la Cruz JP, Reyes JJ, López-Villodres JA, Guerrero A, López-Leiva I, Espartero JL, Labajos MT, González-Correa JA. Hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives inhibit platelet activation after oral administration to rats. *Food Chem Toxicol*. 2013, 58: 295-300.
- Moreno A, De La Cruz JP, Garcia Campos J, Sanchez De La Cuesta F. Prostacyclin-thromboxane balance and retinal vascular pattern in rats with experimentally induced diabetes. *Can J Ophthalmol*. 1995, 30: 117-123.
- Nocella C, Cammisotto V, Fianchini L, D'Amico A, Novo M, Castellani V, Stefanini L, Violi F, Carnevale R. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Diseases: Benefits for Human Health. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018, 18: 4-13.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest*. 1993, 91: 2546–2551.



- Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hule WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoroids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol.* 2000, 38: 647-659.
- Ozawa Y, Kurihara T, Sasaki M, Ban N, Yuki K, Kubota S, Tsubota K. Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model. *Exp Diabetes Res.* 2011, Id. 2011:108328.
- Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabó C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem.* 2005, 12: 267-275.
- Palamarev, E. Paleobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora. 2005. 93-107.
- Pan S, Liu L, Pan H, Ma Y, Wang D, Kang K, Wang J, Sun B, Sun X, Jiang H. Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion injury in mice. *Mol Nutr Food Res.* 2013, 57: 1218–1227.
- Payne AJ, Kaja S, Naumchuk Y, Kunjukunju N, Koulen P. Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina. *Int J Mol Sci.* 2014, 15: 1865-1886.
- Pérez-Martínez P, López-Miranda J, Delgado-Lista J, López-Segura F, Pérez Jiménez F. Aceite de oliva y prevención cardiovascular: más que una grasa. *Clin Invest Arterioscl.* 2006, 18: 195-205.
- Poudyal H, Lemonakis N, Efentakis P, Gikas E, Halabalaki M, Andreadou I, Skaltsounis L, Brown L. Hydroxytyrosol ameliorates metabolic, cardiovascular and liver changes in a rat model of diet-induced metabolic syndrome: Pharmacological and metabolism-based investigation. *Pharmacol Res.* 2017, 17: 32-45.
- Quirantes-Piné R, Herranz-López M, Funes L, Borrás-Linares I, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. *Phytomedicine.* 2013, 20: 1112-1118.
- Raederstorff D. Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *Int J Vitam Nutr Res.* 2009, 79: 152-165.
- Rafehi H, Ververis K, Karagiannis TC. Mechanisms of Action of Phenolic Compounds in Olive. *J Diet Suppl.* 2012, 9: 96–109.
- Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014, 5: 927-946.
- Ramírez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gómez MC, Mir A, et al. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than

- refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J Nutr.* 1999, 129: 2177–2183.
- Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* 2013, 17: 20–33.
- Reguant-Aleix, J., Arbore, M. R., Bach-Faig, A., & Serra-Majem, L. Mediterranean Heritage: an intangible cultural heritage. *Public Health Nutr.* 2009, 12(Special Issue 9A): 1591–1594.
- Reyes JJ, De La Cruz JP, Muñoz-Marin J, Guerrero A, Lopez-Villodres JA, Madrona A, Espartero JL, Gonzalez-Correa JA. Antiplatelet effect of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. *Eur J Nutr.* 2013, 52: 591–599.
- Reyes JJ, Villanueva B, López-Villodres JA, De La Cruz JP, Romero L, Rodríguez-Pérez MD, Rodríguez-Gutiérrez G, Fernández-Bolaños J, González-Correa JA. (2016). Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol In Experimental Diabetes Mellitus. *J Agric Food Chem.* 2017, 65: 4378–4383.
- Rhizopouhu, S. «*Olea europaea* L. A Botanical Contribution to Culture». *American-Eurasian J. Agric Environ.* 2007, 2: 382–387.
- Rietjens SJ, Bast A, de Vente J, Haenen GR. The olive oil antioxidant hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NObullet response of isolated rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007, 292: H1931–H1936.
- Roberts AC, Porter KE. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2013, 10: 472–482.
- Rodríguez-Morató J, Xicota L, Fitó M, Farré M, Dierssen M, de la Torre R. Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2015, 20: 4655–4680.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2012, 125: e2–e220.
- Rojas CA, Bustos RH, Pino CJ, Ariza YV, Gómez RM, Cañadas M. Diabetes-related neurological implications and pharmacogenomics. *Curr Pharm Des.* 2018, 24: 1695–1710.
- Rozati M, Barnett J, Wu D, Handelman G, Saltzman E, Wilson T, et al. Cardio-metabolic and immunological impacts of extra virgin olive oil consumption in overweight and obese older adults: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond).* 2015, 12: 28.
- Rubió L, Macià A, Valls RM, Pedret A, Romero MP, Solà R, Motilva MJ. A new hydroxytyrosol metabolite identified in human plasma: Hydroxytyrosol acetate sulphate. *Food Chem.* 2012, 134: 1132–1136.



- Sagoo MK, Gnudi L. Diabetic nephropathy: Is there a role for oxidative stress? *Free Radic Biol Med.* 2018 Feb 20; 116:50-63.
- Sagoo MK, Gnudi L. Diabetic Nephropathy: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2020, 2067: 3-7.
- Salami M, Galli C, De Angelis L, Visioli F. Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacol Res.* 1995, 31: 275–279
- Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MÁ, Ibarrola-Jurado N, Basora J, et al. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes With the Mediterranean Diet Results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care.* 2011, 34: 14-19.
- Sala-Vila A, Romero-Mamani ES, Gilabert R, Núñez I, de la Torre R, Corella D, et al. Changes in Ultrasound-Assessed Carotid Intima-Media Thickness and Plaque With a Mediterranean Diet A Substudy of the PREDIMED Trial. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol.* 2014, 34: 439-445.
- Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Aparicio-Soto M, Cárdeno A, Rosillo MÁ, González-Benjumea A, Marset A, López Ó, Maya I, Fernández-Bolaños JG, Alarcón de la Lastra C. Effects of dietary virgin olive oil polyphenols: hydroxytyrosyl acetate and 3, 4-dihydroxyphenylglycol on DSS-induced acute colitis in mice. *J Nutr Biochem.* 2015, 26: 513-520.
- Schäfer A1, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2008, 6: 52-60.
- Schildknecht S, Ullrich V. Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2009, 484: 183-189.
- Schildknecht S, van der Loo B, Weber K, Tiefenthaler K, Daiber A, Bachschmid MM. Endogenous peroxynitrite modulates PGHS-1-dependent thromboxane A<sub>2</sub> formation and aggregation in human platelets. *Free Rad Biol Med.* 2008, 45: 512-520.
- Serrelli G, Deiana M. Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Modulation of Cellular Pathways Related to Oxidant Species and Inflammation in Aging. *Cells.* 2020, 9: 478-499.
- Servili M, Taticchi A, Esposto S, Urbani S, Selvaggini R, Montedoro G. Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *J Agric Food Chem.* 2007, 55: 7028–7035.
- Shi Y., Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes.* 2017, 9, 434-449.
- Silva S, Bronze MR, Figueira ME, Siwy J, Mischak H, Combet E, et al. Impact of a 6-wk olive oil supplementation in healthy adults on urinary proteomic biomarkers

of coronary artery disease, chronic kidney disease, and diabetes (types 1 and 2): a randomized, parallel, controlled, double-blind study *Am J Clin Nutr*, 2015, 101: 44–54.

Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers H. J. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric*. 2000, 80: 1013–1023.

Storniolo CE, Roselló-Catafau J, Pintó X, Mitjavila MT, Moreno JJ. Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biol*. 2014, 2C: 971-977.

Stulc T, Ceska R, Marinov I, Skrha J. The effect of simvastatin and fenofibrate on the expression of leukocyte adhesion molecules and lipopolysaccharide receptor CD14 in type 2 diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012, 33 (Suppl 2):73-77.

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglodi D, Szabo A, Kovacs K, Szalontai B, Setalo G Jr, Banki E, Csanaky K, Tamas A, Gabriel R. Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglodi D, Szabo A, Kovacs K, Szalontai B, Setalo G Jr, Banki E, Csanaky K, Tamas A, Gabriel R. *Cell Tissue Res*. 2012, 348: 37-46.

Ting HH, Timimi FK, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation*. 1997, 95: 2617–2622.

Toledo E, Hu FB, Estruch R, Buil-Cosiales P, Corella D, Salas-Salvadó J, et al. Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: results from a randomized controlled trial. *BMC Med*. 2013, 11: 207.

Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, Siasos G, Latsios G, Tentolouris K, Stefanadis C. Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J Am Coll Cardiol*. 2013, 62: 667-676.

Toyoda F, Tanaka Y, Shimmura M, Kinoshita N, Takano H, Kakehashi A. Diabetic Retinal and Choroidal Edema in SDT Rats. *J Diabetes Res*. 2016, Id. 2016:2345141.

Tresserra-Rimbau A, Rimm EB, Medina-Remón A, Martínez-González MA, de la Torre R, Corella D, et al. Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014, 24: 639–647.

Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet - An expression of culture, history and lifestyle. *Nutr Rev*. 1997, 55: 383-389.

Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem*. 2002, 13: 636–644.

- Tuck KL, Hayball PJ, Stupans I. Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50: 2404–2409.
- Urpi-Sarda M, Casas R, Chiva-Blanch G, Romero-Mamani ES, Valderas-Martínez P, Salas-Salvadó J, et al. The Mediterranean diet pattern and its main components are associated with lower plasma concentrations of tumor necrosis factor receptor 60 in patients at high risk for cardiovascular disease. *J Nutr.* 2012, 142: 1019–1025.
- Venturini D, Simão ANC, Urbano MR, Dichi I. Effects of extra virgin olive oil and fish oil on lipid profile and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition.* 2015, 31: 834–840.
- Verhoeven V, Van der Auwera A, Van Gaal L, Remmen R, Apers S, Stalpaert M, et al. Can red yeast rice and olive extract improve lipid profile and cardiovascular risk in metabolic syndrome? A double blind, placebo controlled randomized trial. *BMC Complement Altern Med.* 2015, 15: 52.
- Villarreal M, Ciudin A, Hernández C, Simó R. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World J Diabetes.* 2010, 1: 57–64.
- Vinha AF, Ferreres F, Silva BM, Valentão P, Gonçalves A, Pereira JA, Andrade PB. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.* 2005, 89: 561–568.
- Violante B, Gerbaudo L, Borretta G, Tassone F. Effects of extra virgin olive oil supplementation at two different low doses on lipid profile in mild hypercholesterolemic subjects: a randomized clinical trial. *J Endocrinol Invest.* 2009, 32: 794–796.
- Visioli F, Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev.* 1998b, 56: 142–147.
- Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J. Nutr.* 2002, 132: 409–417.
- Widmer RJ, Freund MA, Flammer AJ, Sexton J, Lennon R, Romani A, et al. Beneficial effects of polyphenol-rich olive oil in patients with early atherosclerosis. *Eur J Nutr.* 2013, 52: 1223–1231.
- Wong RHX, Gard ML, Wood LG, Howe PRC. Antihypertensive potential of combined extracts of olive leaf, green coffee bean and beetroot: A randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *Nutrients.* 2014, 6: 4881–4894.
- Yubero-Serrano EM, Fernandez-Gandara C, Garcia-Rios A, Rangel-Zuñiga OA, Gutierrez-Mariscal FM, Torres-Peña JD, et al. Mediterranean diet and endothelial function in patients with coronary heart disease: An analysis of the CORDIOPREV randomized controlled trial. *PLoS Med.* 2020, 17(9): e1003282.

- Zhang X, Wang N, Barile GR, Bao S, Gillies M. Diabetic retinopathy: neuron protection as a therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013, 45: 1525-1589.
- Zhong YW, Wu J, Hu HL, Li WX, Zhong Y. Protective effect 3,4-dihydroxy-phenyl-ethanol in subarachnoid hemorrhage provoked oxidative neuropathy. *Exp Ther Med.* 2016, 12: 1908-1914.
- Zou X, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertz K, Weber P, Fu Y, Liu J. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem.* 2012, 23: 994-1006.





ANEXOS





**INFORME Nº: 69**  
**ANEXO VIII**

**INFORME DEL ORGANO HABILITADO (Art. 34 del RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia)**

D. Ricardo González Carrascosa Latín, como Secretario del Órgano Habilitado Comité Ético de Experimentación Animal de Universidad de Málaga

DECLARA:

1. Que el siguiente proyecto (Título del proyecto):

**Efecto sinérgico de compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la inflamación vascular en diabetes.**

2. Que tiene una duración de:

3 Años

36 Meses

3. Que está realizado por (Datos del investigador principal o persona responsable):

Apellidos: González Correa

Nombre: Jose Antonio

Categoría (s) (según RD 1201/2005): B y C

Fecha acreditación: (26/07/2006)

Centro/Facultad/Empresa, Dpto, Dirección, Código Postal, Ciudad, Teléfono, Fax, E-Mail  
Departamento Farmacología y Pediatría. Facultad de Medicina.

Bulevard Louis Pasteur, 32

29010 Málaga. MÁLAGA

Tel.: 952131569

Correo E.: correa@uma.es







## INFORME Nº: 69

4. Que ha sido evaluado con un nivel de detalle apropiado al tipo de proyecto y la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los siguientes requisitos de acuerdo al artículo 34 del RD 53/2013:

- a) Está justificado desde el punto de vista científico o educativo, o debe realizarse por imposición legal o reglamentaria;
- b) su finalidad justifica la utilización de animales; y
- c) está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible

5. Que ha sido revisado basándose en las reuniones internas desarrolladas por el Órgano Habilitado de Universidad de Málaga en las siguientes fechas:

Reunión 37ª del 12/05/2018

Acta Nº 37 del 12/05/2018

Y

Reunión 40ª del 31/08/2018

Acta Nº 40 del 31/08/2018

Nº expediente 31-2018-A

6. Que el proceso de evaluación ha sido transparente, se ha realizado de modo imparcial, pudiendo integrar la opinión de partes independientes (según el apartado 3 del artículo 34 del RD 53/2013).
7. Que ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.
8. Que basándose en la documentación presentada por el investigador responsable se ha realizado la siguiente EVALUACIÓN:

Evaluación de su finalidad, de los beneficios científicos que se prevén alcanzar o de su valor docente

**Favorable**

Evaluación de su conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento

**Favorable**





## INFORME Nº: 69

Evaluación y clasificación de sus procedimientos en función del grado de severidad:

Procedimiento nº 1: Modelo inducido de diabetes mediante inoculación de estreptozotocina y tratamiento con compuestos fenólicos de aceite de oliva.

Evaluación: **Favorable**

Clasificación: Moderado

Análisis de los daños y beneficios, para determinar si los daños, el sufrimiento, el dolor y la angustia que se les puedan causar a los animales están justificados por los resultados esperados, teniendo en cuenta consideraciones éticas y los beneficios que, en definitiva, pueda suponer el proyecto para los seres humanos, los animales o el medio ambiente:

**Favorable**

Examen de las situaciones y excepciones previstas en los artículos 6, 7, 9.1, 19, 20, 21, 22, 23, 25.3, 25.5, 26 y 29 del RD 53/2013:

Situaciones: La investigadora Ana Vázquez Pérez no posee la acreditación necesaria para realizar procedimientos de experimentación animal.

Excepciones: Colaborará en el procedimientos clasificados como leves, siempre bajo supervisión del Dr. José A. González Correa y M<sup>a</sup> Dolores Rodríguez Pérez. Artículo 25.5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable. El periodo máximo hasta que consiga su acreditación es 6 meses.

Determinación de si el proyecto debe evaluarse de forma retrospectiva y, en su caso, cuando debería realizarse

Motivación de la evaluación retrospectiva:

*No procede*

Resultado:

X No

Periodo de realización (en caso afirmativo): No procede

Documentación para realizar la evaluación retrospectiva (en caso afirmativo):

*No procede*





## INFORME Nº: 69

### CONFIRMO:

1. Que el proyecto ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.
2. Que el proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, por lo anteriormente expuesto, se clasifica como:

**Proyecto Tipo II**

3. Que la evaluación del proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, resulta ser:

**FAVORABLE**

### OBSERVACIONES:

4. Que este documento tiene una vigencia máxima de 5 años.

Secretario Órgano Habilitado  
Nombre: Ricardo González Carrascosa Latín  
Fecha: 01/08/2018  
Firma:

Presidente Órgano Habilitado  
Nombre: Teodomiro López Navarrete  
Fecha: 01/08/2018  
Firma:

